

Université de Montréal

**Rôle des ligands du récepteur au CNTF dans le  
développement et étude de la signalisation  
induite par ces cytokines dans des modèles  
cellulaires de cancer**

par

Guilhot Florence

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en Pharmacologie

Avril, 2007

© Guilhot, 2007





## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle des ligands du récepteur au CNTF dans le développement et étude de la  
signalisation induite par ces cytokines dans des modèles cellulaires de cancer

présentée par :  
Guilhot Florence

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

André DeLéan, président-rapporteur  
Jean-François Gauchat, directeur de recherche  
Audrey Claing, membre du jury  
Yves Saint-Pierre, examinateur externe  
Michel Cayouette, représentant du doyen de la FES



*A la mémoire de ma petite soeur*

## Résumé

Les cytokines sont des protéines solubles qui interviennent dans la communication cellulaire entre les cellules d'un organisme. Elles agissent sur de nombreux types cellulaires en se fixant sur leurs récepteurs membranaires spécifiques. La famille du CNTF, qui comprend le CNTF, le complexe CLC/CLF et la neuropoïétine, se caractérise par l'utilisation d'un récepteur comprenant une sous-unité alpha et des chaînes réceptrices de signalisation gp130 et LIFR $\beta$ . Alors que la chaîne alpha est spécifique, les chaînes transductrices du signal sont partagées avec d'autres membres de la famille de l'IL-6. Le CNTFR est exprimé principalement par les cellules du système nerveux et les muscles squelettiques. Le premier ligand décrit pour ce récepteur est le CNTF qui est synthétisé par les astrocytes et les cellules de Schwann. Le CNTF ne possède pas de peptide signal, il n'est pas sécrété dans le milieu extracellulaire. Cette cytokine a essentiellement un rôle neurotrophique et myotrophique lors d'événements traumatiques comme la dénervation. L'inactivation du gène codant pour le CNTFR $\alpha$  chez la souris conduit à un phénotype très sévère avec la mort périnatale des animaux. La grande différence entre le phénotype silencieux des souris CNTF $^{-/-}$  et la gravité de celui des souris CNTFR $^{-/-}$  a suggéré l'existence d'autres ligands du récepteur au CNTF. Le complexe CLC/CLF est le premier de ces ligands alternatifs à avoir été identifié. CLC/CLF, comme le CNTF, a des activités neurotrophiques. Décrite en 2004, la neuropoïétine s'avère être un troisième ligand pour le récepteur au CNTF. Cette cytokine semble contribuer au développement nerveux chez la souris, mais peu de données sont disponibles sur les voies de signalisation qu'elle recrute lors de l'activation de son récepteur. Nous avons donc étudié les voies de signalisation empruntées par la neuropoïétine et la modulation de gènes en réponse à cette cytokine. Dans le but d'étudier plus précisément le rôle de CLC et de la neuropoïétine dans le développement, nous avons entrepris de générer des souris transgéniques invalidées pour ces gènes. Lors de son identification, l'ARNm de CLF a été détecté dans une lignée cellulaire de tumeur du sein, la lignée MCF-7, qui exprime également l'ARNm codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur au CNTF. Nous avons donc étudié l'expression et le rôle de CLC/CLF dans des lignées de cancer du sein et dans des tumeurs mammaires. Nos

observations suggèrent que CLC/CLF pourrait être un des facteurs participant à la multiplication autocrine des cellules tumorales mammaires.

**Mots-clés** : CNTFR, CLC/CLF, CNTF, neuropoïétine, cancer du sein, souris Knock-Out

## Abstract

Cytokines are soluble proteins which play a role in the cellular communication between the cells of an organism. They act on many cellular types by activating specific membrane receptors. Receptor of cytokines belonging to the CNTF family (CNTF, CLC/CLF and NP) comprises a non-signaling specific alpha chain and two signaling chains, gp130 and LIFR $\beta$ . Whereas the alpha chain is specific, the signaling chains are shared with other members of the IL-6 family. The CNTFR is mainly expressed by nervous system and skeletal muscle cells. The first ligand described for this receptor is CNTF which is synthesized by astrocytes and Schwann cells. The CNTF does not have a peptide signal, and is not secreted in the extracellular medium. CNTF has primarily neurotrophic and myotrophic roles at the time of traumatic events like denervation. In mice, the CNTFR $\alpha$  gene inactivation leads to a very severe phenotype: mice die perinatally and display severe motor neuron deficits. The difference between the phenotype of CNTF $^{-/-}$  mice and CNTFR $^{-/-}$  mice suggested the existence of other developmentally important CNTFR ligands. CLC/CLF was the first alternative CNTFR ligand to be identified. Like CNTF, this composite cytokine has neurotrophic activities. In 2004, a third ligand for the CNTF receptor, named neuropoietin, was described. This cytokine seems to contribute to the nervous system development in the mouse but the signalisation pathways recruited upon activation of the CNTFR by neuropoietin were largely uncharacterized. We therefore studied the signalisation pathways used by neuropoietin and the modulation of genes in response to this cytokine. To investigate the roles of CLC and neuropoietin in the development, we initiated the generation of transgenic mice invalidated for these genes. Furthermore, during its identification, CLF mRNA was detected in the MCF-7 breast tumour cell line, expressing also the mRNA coding for the  $\alpha$  chain of the CNTF receptor. We therefore studied the expression and role of CLC/CLF in breast cancer cell lines and breast tumour. Our results suggest that CLC/CLF could contribute in the autocrine multiplication of mammary tumour cells.

**Keywords :** CNTFR, CLC/CLF, CNTF, neuropoietin, breast cancer, Knock-Out mice

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>xv</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>xv</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1. LES RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE GP130 ET LEURS VOIES DE SIGNALISATION ..</b>	<b>4</b>
I. La famille des cytokines gp130 et leurs récepteurs .....	4
A. Généralités : Cytokines et récepteurs .....	4
B. Le récepteur au CNTF .....	5
1. Structure .....	5
2. Profil d'expression et phénotype des souris CNTFR $\alpha$ <sup>-/-</sup> .....	7
3. Les ligands du CNTFR .....	7
II. Les voies de signalisation.....	8
A. La voie de signalisation JAK-STAT .....	8
1. Mécanisme général de transduction du signal activé par un complexe cytokine/récepteur.....	8
2. Les « Janus Kinases » .....	9
3. Les STATs ou « Signal Transducers and Activators of Transcription » .....	12
B. Les protéines adaptatrices et la famille des MAP kinases .....	13
C. La voie de la « Phosphatidyl Inositol 3 Kinase».....	14
D. La régulation négative de la signalisation intracellulaire.....	14
1. Les PIAS ou « protein inhibitory of activated STAT » .....	15
2. Les protéines SOCS et leur fonction.....	15
3. Les protéines tyrosine phosphatases.....	16
4. Autres systèmes de régulation négative de la transduction du signal .....	17
<b>CHAPITRE 2. LES LIGANDS DU RÉCEPTEUR AU CNTF .....</b>	<b>19</b>
I. Le CNTF, une cytokine gliale au secours des neurones .....	19

A.	Structure, expression et synthèse du CNTF .....	19
B.	Récepteur et signalisation .....	21
C.	Axokine® ou CNTF humain recombinant .....	23
D.	Cibles et effets biologiques du CNTF .....	23
1.	Différenciation.....	23
2.	Neuroprotection.....	24
3.	CNTF et muscle squelettique .....	25
4.	Autres cibles du CNTF.....	26
E.	CNTF et maladies neurodégénératives.....	26
1.	Sclérose latérale amyotrophique (SLA) .....	26
a.	Caractéristiques de la maladie .....	27
b.	Essais cliniques.....	27
2.	Dégénérescence striatale et chorée de Huntington .....	28
a.	Caractéristiques de la maladie.....	28
b.	Modèles animaux de la chorée de Huntington.....	29
c.	Essais thérapeutiques .....	29
3.	Sclérose en plaques.....	30
a.	Caractéristiques de la maladie.....	30
b.	L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle animal de la sclérose en plaques .....	31
4.	Effets secondaires du CNTF.....	31
F.	Le CNTF dans le traitement de l'obésité et du diabète.....	33
1.	Régulation du poids et obésité .....	33
2.	Rôle du CNTF dans le traitement de l'obésité .....	33
G.	CNTF et maladies cardiovasculaires.....	37
H.	Dégénérescence rétinienne.....	38
I.	Conclusions.....	39
II.	<i>Le second ligand du CNTFR : le complexe CLC/CLF.....</i>	<i>40</i>
A.	Clonage et profil d'expression de CLF.....	40
B.	Clonage et profil d'expression de CLC .....	41
C.	La sécrétion de CLC.....	42
D.	Rôles physiologiques de CLC.....	44
1.	Fonction neurotrophique .....	44
2.	Effets stimulants de CLC sur les cellules B.....	44
3.	Modulation neuroimmunocrine de la fonction corticotrope.....	45
4.	Dernières fonctions attribuées à CLC/CLF.....	45
E.	Le "Cold-Induced Sweating Syndrome".....	46
F.	Conclusion .....	47
III.	<i>La neuropoïétine, dernier ligand identifié du récepteur au CNTF.....</i>	<i>48</i>

### CHAPITRE 3. ACTIVATION DES STATS ET RÔLE DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL-6

#### DANS LE CANCER DU SEIN ..... 49

I.	<i>Le cancer du sein : une pathologie multifactorielle</i> .....	49
A.	Physiologie et développement du sein .....	50
B.	Rôle des hormones .....	50
C.	Mécanismes de déclenchement tumoral .....	51
D.	Classification.....	52
E.	Stratégies thérapeutiques .....	53
1.	Chirurgie.....	53
2.	Radiothérapie.....	53
3.	Chimiothérapie.....	53
a.	Les antimitotiques.....	53
b.	Les agents alkylants .....	54
c.	Les antimétabolites .....	54
d.	Les inhibiteurs de la topoisomérase II.....	54
e.	Résistances .....	54
4.	Hormonothérapie .....	54
5.	Nouvelles stratégies thérapeutiques.....	55
II.	<i>Rôle des STATs dans l'oncogenèse du cancer du sein</i> .....	56
A.	STAT1 : un rôle modérateur de la croissance cellulaire .....	57
B.	Rôle de STAT3 et STAT5 dans l'oncogenèse humaine .....	58
1.	Activation constitutive de STAT3 .....	58
2.	STAT3 et la formation de métastases .....	59
3.	STAT5 dans l'oncogenèse.....	60
III.	<i>Rôle des cytokines de la famille de l'IL-6 dans le cancer du sein</i> .....	60
A.	L'IL-6.....	61
B.	L'OSM .....	61
C.	Le LIF.....	62
D.	L'IL-11.....	62
E.	Conclusion .....	62

#### Résultats ..... 64

### CHAPITRE 4. RÔLE DE CLC ET DU CNTF DANS LE CANCER DU SEIN ..... 64

I.	<i>Introduction</i> .....	64
II.	<i>ARTICLE 1 : Human breast cancer cell lines can co-express functional ciliary neurotrophic factor receptor and its ligand, cardiotrophin like cytokine.</i> .....	66

### CHAPITRE 5. GÉNÉRATION DE SOURIS TRANSGÉNIQUES ..... 98

I.	<i>Généralités</i> .....	98
A.	Knock-Out « conventionnel » .....	98

B. Stratégie Knock-In .....	99
C. Knock-Out ou Knock-In conditionnels .....	100
D. Les systèmes de recombinaison .....	102
E. Différentes étapes pour générer une souris transgénique .....	103
<b>II. CHOIX DES CIBLES .....</b>	<b>105</b>
<b>III. Inactivation de CLC : Modèle de Souris Knock-In conditionnel.....</b>	<b>106</b>
A. Le choix du Knock-In conditionnel.....	106
B. Stratégie et description du vecteur cible.....	107
C. Vérifications de l'intégrité du vecteur .....	111
D. Génération des cellules souches embryonnaires recombinantes .....	112
1. Caractéristiques des cellules souches embryonnaires .....	112
2. Transfection des cellules souches embryonnaires CK35.....	113
3. Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes .....	114
a. Criblage par PCR.....	114
b. Criblage par Southern Blot.....	115
c. Vérification de la présence du loxP en 5' de l'exon 3.....	122
4. Excision du gène de résistance .....	123
5. Analyse des caryotypes.....	125
E. Génération des souris transgéniques .....	128
1. Choix des blastocystes.....	128
2. Injection dans les blastocystes des cellules souches embryonnaires recombinantes sélectionnées et obtention des chimères. ....	129
3. Études de la transmission germinale .....	131
F. Inactivation du gène <i>clc</i> .....	132
G. Perspectives.....	135
<b>IV. Description du Knock-Out de la neuropoïétine .....</b>	<b>137</b>
A. Stratégie et description du vecteur cible.....	137
B. Vérifications de l'intégrité du vecteur .....	140
C. Perspectives.....	141
<b>CHAPITRE 6. VOIES DE SIGNALISATION EMPRUNTÉES PAR LA NEUROPOIÉTINE .....</b>	<b>142</b>
I. Introduction .....	142
II. ARTICLE 2 : <i>Signalling pathways recruited by neuropoietin, a newly identified CNTF receptor ligand.....</i>	144
<b>Discussion .....</b>	<b>176</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>192</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>I</b>



## Remerciements

Je remercie tout d'abord Dr André Deléan, Dr Audrey Claing et Dr Yves SaintPierre d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et de siéger dans ce jury.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, Jean-François Gauchat pour avoir m'avoir accueillie dans son laboratoire, et pour m'avoir encouragée tout au long de ce parcours. Merci pour tes conseils scientifiques et pour ton soutien moral. Merci de m'avoir soutenue et orientée dans les bons comme dans les mauvais moments.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à Hugues Gascan et Sylvie Chevalier sans qui je n'aurai pu terminer cette thèse. Merci de m'avoir accueillie et intégrée au sein de votre équipe, merci pour la confiance et le soutien que vous m'avez apporté. Merci pour l'encadrement et votre disponibilité, votre aide m'a été très précieuse.

Je tiens à remercier Odile DeLapeyrière pour son accueil et ses conseils lors de mes séjours dans son laboratoire à Marseille. J'ai vraiment apprécié notre collaboration.

Merci à toute l'équipe du Dr Gauchat avec qui j'ai partagé une bonne partie de mon temps. Je souhaite bonne chance à Isa, Angélique, Alex, Sandrine et Marie-Ève pour la suite de leur parcours.

Merci à toute l'équipe du Dr Gascan, Marie-Hélène, Léna, Patricia, Sylvie, Véro, Patrice, Josy, Fabien et Yaya pour votre aide quotidienne.

Merci aux filles du labo U564 pour m'avoir intégrée, soutenue et encouragée tout au long de cette année. Je vous adore et je vous dois une partie de ma réussite. En particulier, merci à Zaza et Émilie pour votre bonne humeur, vos délires loufoques et vos crises de fous rires communicatives. Merci à Bibine pour ton rire tordu. Merci à Linda pour ton écoute et les soirées piscine. Merci à Laetitia, tu vas pouvoir enfin intégrer ce bureau de folie!!! Merci à Laurence pour ton soutien, tes conseils et les bonnes soirées passées ensemble. Et merci à

Catherine pour ton écoute et le réconfort que tu as su m'apporter dans les moments difficiles. Un énorme merci à vous toutes!!!

Je souhaite remercier Bernie pour tous les bons moments passés en ta compagnie sur Marseille. Merci et tous mes vœux de bonheur pour ta vie future!

Merci à Yves Delneste et Pascale Jeannin pour vos conseils et votre aide sur le monde professionnel. Merci à toute l'équipe, Céline, Isa, Dorothée, Mari, Ulrich et Fang pour votre bonne humeur. Un merci sportif à Simon et Chacha pour les parties de Squash explosives!! Je vous aurai un jour!

Merci à Juju et Chachatte pour votre bonne humeur et les bons moments passés ensemble en particulier sur les plongeoirs.

Merci à Agnès pour nos combats de Karaté et nos petites soirées!

Merci à toute ma famille, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, Julie et Marionnette que j'adore. Un merci tout particulier à mes grands parents qui sont des personnes exceptionnelles.

Merci à tous mes amis dispersés en France et à l'étranger, ainsi que tous ceux en Auvergne. Vous m'avez témoignée un soutien formidable.

Valou, Floflo, Calou, Isa, les Aurels, Cynthia!! Aucun mot ne pourra jamais exprimer ce que vous avez pu m'apporter. Votre soutien représente une valeur inestimable alors je souhaite simplement vous dire Merci! Des amis comme vous, j'en souhaite vraiment à tout le monde!!! Floflo, merci pour toutes tes attentions, ton écoute exceptionnelle et les fous rires qu'on partage!! Et Valou, t'es une véritable sœur pour moi!

Enfin, je souhaite remercier mes parents. Tout d'abord, merci d'avoir épongé mes larmes et de m'avoir boostée pendant les moments difficiles. Durant mes nombreuses années d'études et en particulier durant ma thèse, vous m'avez toujours soutenue et vous avez toujours cru en moi. Sans vous, je ne serai pas ce que je suis devenue aujourd'hui. Je vous dois toute ma réussite. Je vous aime!

## Liste des abréviations

5-FU : 5-fluorouracile

ABC protein : ATP binding cassette protein

ACC : acétyl-coenzyme A carboxylase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AgRP : agouti-related protein

Akt : serine threonine kinase protein B

AMP : adénosine mono-phosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BCR/ABL : Breakpoint cluster region/Abelson murine leukaemia oncogene

BGH : bovine growth hormone

BSF-3 : B cell-stimulating factor-3

CAT : chloramphenicol acetyl transferase

CBD : cytokine binding domain

CISS : cold-induced sweating syndrome

CLC : cardiotrophin like cytokine

CLF : cytokine like factor

CNTF : ciliary neurotrophic factor

CNTFR $\alpha$  : sous-unité  $\alpha$  du récepteur au CNTF

CT-1 : cardiotrophine 1

Da : Dalton

EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale

EGF : epidermal growth factor

ER : estrogen receptor

ERK : extracellular regulated kinase

ES cells: embryonic stem cells

ESS : extended SH2 domain

EST : expressed sequence tag

FGF : fibroblast growth factor

FLP : Flippase  
FnIII : fibronectine de type III  
FRT : FLR recombinase target  
Gab-1 : GRB2-associated binding protein 1  
GFAP : glial fibrillary acidic protein  
GFP : green fluorescent protein  
gp : glycoprotéine  
GPI : glycosyl-phosphatidylinositol  
Grb2 : growth factor receptor bound protein 2  
HSP : heat shock protein  
Ig like : immunoglobulin like  
IGF : insuline growth factor  
IL : interleukine  
IL-11Ra : sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-11  
IL-6Ra : sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-6  
IRES : Internal ribosomal entry site  
JAK : Janus kinase  
JH : Jak homology domain  
KIR : kinase inhibitory region  
KO : Knock-Out  
LIF : leukemia inhibitory factor  
LIFR $\beta$  : sous-unité  $\beta$  du récepteur au LIF  
lacZ : gène de la  $\beta$ -galactosidase  
loxP : locus of cross-over (x) in P1  
MAPK : mitogen activated protein kinase  
MAPKK : mitogen activated protein kinase kinase  
MBP : myelin basic protein  
MOG : myelin oligodendrocytes glycoprotein  
MTX : méthotrexate  
Neo : néomycine  
NNT-1 : novel neurotrophin-1  
NP : neuropoietin  
NPY : neuropeptide Y

OSM : oncostatine M  
OSMR $\beta$  : sous-unité  $\beta$  du récepteur à l'OSM  
PACAP : pituitary adenylate-cyclase- activating polypeptide  
PCR : polymerase chain reaction  
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase  
PIAS : protein inhibitory of activated STAT  
PLP : proteolipidic protein  
POMC : pro-opiomelanocortin  
PTB : phosphotyrosine binding  
RZPD : Resource Centre of the German Human Genome Project  
sCNTFR : récepteur soluble au CNTF  
SH2-SH3 : Src homology 2-3  
SHP : SH2 domain containing tyrosine phosphatase  
SLA : sclérose latérale amyotrophique  
SNC : système nerveux central  
SNP : système nerveux périphérique  
SOCS : supressor of cytokine signaling  
SOS : son of sevenless  
STAT : signal transducer and activator of transcription  
SV 40 : simian virus 40  
Tc-PTP : T-cell protein tyrosine phosphatase  
TGF : tumor growth factor  
Th : T helper  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$   
VEGF : vascular endothelial growth factor  
VIP : vasoactive intestinal peptide  
WSXWS : tryptophane-sérine-acide aminé quelconque-tryptophane-sérine

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6. ....	4
Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un récepteur de cytokine de type I : exemple du récepteur de haute affinité de l'IL-6. ....	5
Figure 3 : Représentation schématique des structures modulaires de CNTFR $\alpha$ , gp130 et LIFR $\beta$ . ....	6
Figure 4 : Signalisation de l'IL-6 via la voie de signalisation JAK-STAT .....	9
Figure 5 : Organisation structurale des composants de la voie de signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6. ....	11
Figure 6 : Voies de signalisation induites par les cytokines de la famille de l'IL-6. ....	14
Figure 7 : Mécanismes de régulation négative dans la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6 .....	18
Figure 8 : Le CNTF mène à une perte de poids et à une neurogénèse. ....	35
Figure 9 : Les sites d'interaction de CLC avec les chaînes réceptrices .....	43
Figure 10 : Stratégie de construction du Knock-In conditionnel de CLC.....	108
Figure 11 : Un fragment de 15kb correspondant au gène de CLC a été modifié en floxant l'exon 3 de ce gène. ....	110
Figure 12 : Fonctionnement des sites LoxP du vecteur cible de CLC. ....	112
Figure 13 : Criblage par PCR. ....	114
Figure 14 : Mise au point des conditions de PCR pour le criblage des cellules souches embryonnaires. ....	115
Figure 15 : Sondes utilisées pour le criblage des clones recombinants par Southern Blot. ....	116
Figure 16 : Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes par Southern Blot avec une sonde 5' externe. ....	117
Figure 17 : Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes par Southern Blot avec une sonde 3' externe. ....	119

Figure 18 : Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes par Southern Blot avec une sonde interne. ....	121
Figure 19 : Présence du site LoxP en 5' de l'exon 3 de CLC. ....	122
Figure 20 : Caryotype des cellules souches embryonnaires. ....	127
Figure 21 : Souris chimériques. ....	130
Figure 22 : Obtention d'une souris nulle pour clc. ....	133
Figure 23 : Obtention d'une souris nulle pour CLC dans un tissu spécifique .....	135
Figure 24 : Stratégie Knock-In employée pour inactiver le gène de la neuropoiétine. ....	138
Figure 25 : Carte du vecteur cible utilisé pour la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires. ....	139
Figure 26 : Élimination du gène de sélection à la néomycine. ....	140

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales étapes pour générer une souris transgéniques.....	105
Tableau 2 : Caractéristiques des chimères obtenues.....	130



## Introduction

La coordination des fonctions de chaque cellule est indispensable à la survie de l'organisme et donc des cellules elles-mêmes. Ce contrôle des fonctions cellulaires s'effectue par l'intermédiaire de contacts directs entre les cytosols des cellules voisines (« gap junctions ») ou au moyen de messagers chimiques qui véhiculent l'information. Les médiateurs de l'organisme assurent les dialogues entre les divers types cellulaires pour une bonne harmonie de ces diverses fonctions.

Les cytokines sont des médiateurs solubles de la communication intercellulaire. Ce sont généralement des molécules de faible poids moléculaire, exprimées transitoirement, et qui agissent le plus souvent sur un mode autocrine ou paracrine. Elles sont impliquées dans la régulation de la survie cellulaire, la croissance, la différenciation, l'hématopoïèse et les réponses immunitaires. Leur durée de vie est généralement courte *in vivo* et elles sont rapidement dégradées dans l'organisme. Chaque cytokine va agir sur plusieurs types cellulaires différents, on parle alors de pléiotropie. Différentes cytokines peuvent avoir un effet identique sur une cellule donnée, elles sont alors redondantes. Le signal initié par la fixation d'une cytokine sur son récepteur est ensuite relayé à l'intérieur de la cellule par l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires allant jusqu'au noyau où la réponse cellulaire est amorcée. Les voies de signalisation aboutissent à la régulation de la transcription des gènes.

Les cytokines hélicoïdales de classe I constituent un large groupe de molécules qui jouent un rôle clé dans une multitude de processus physiologiques. Bien que les cytokines présentent peu d'homologie entre elles dans leur structure primaire, elles ont pu être regroupées en plusieurs familles selon leur structure tridimensionnelle. C'est d'abord Bazan qui a remarqué des homologies dans les structures secondaire et tertiaire de certaines cytokines, permettant de définir des motifs en hélices  $\alpha$  (Bazan, 1990). Il a ainsi prédit une structure en quatre hélices  $\alpha$  disposées de façon anti-parallèle deux à deux. La plupart des complexes récepteurs de haute affinité des cytokines de type I sont composés d'au moins deux chaînes distinctes, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Le plus souvent, les sous-unités  $\alpha$

fixent spécifiquement la cytokine, puis ce complexe s'associe à une ou plusieurs sous-unités  $\beta$  qui assureront la transduction du signal. La chaîne de transduction peut être commune à plusieurs cytokines, et aussi permettre de définir des sous-familles fonctionnelles à l'intérieur de la famille des cytokines de type I. Ainsi, les récepteurs des membres de la famille de l'IL-6 partagent la chaîne réceptrice de transduction gp130. Le signal induit par les cytokines de type I emprunte la voie de signalisation JAK/STAT (Heinrich *et al*, 1998).

Les cytokines de la famille de l'IL-6 incluait jusqu'à récemment six membres : l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 11 (IL-11), le ciliary neurotrophic factor (CNTF), le leukemia inhibitory factor (LIF), l'oncostatine M (OSM) et la cardiotrophine I (CT-1) qui exerçaient un large spectre d'effets biologiques *in vitro*. En 1999, un nouveau membre de la famille des cytokines utilisant gp130 a été identifié par deux groupes de recherche indépendants et a été nommée « Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF3) ou « Cardiotrophin-like cytokine » (CLC) (Senaldi *et al*, 1999; Shi *et al*, 1999). Dans ce rapport, cette cytokine sera référencée sous le terme de CLC. Depuis l'identification de CLC, différents articles ont permis de connaître son profil d'expression, les voies de signalisation engagées et les effets biologiques dans différents systèmes cellulaires. CLC est principalement exprimée dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques ou la rate, mais elle est aussi détectée dans d'autres organes incluant la moelle osseuse, les ovaires, le placenta, le rein, la glande pituitaire et autres (Shi *et al*, 1999). CLC est un nouveau ligand du récepteur au « Ciliary Neurotrophic Factor » (CNTF) abrégé CNTFR et active principalement la cascade de signalisation JAK-STAT. Contrairement au CNTF, CLC peut être activement sécrétée par les cellules sous forme de complexes avec le récepteur soluble aux cytokines de type I, « Cytokine-Like Factor-1 » (CLF) (Elson *et al*, 2000) ou le récepteur soluble au CNTF (sCNTFR) (Plun-Favreau *et al*, 2001). Ainsi, CLC est un nouveau ligand sécrété sous forme de cytokine composite et agit sur le récepteur du CNTF.

En 2004, la neuropoïétine (NP) a été identifiée comme la dernière cytokine appartenant à la famille de l'IL-6 par le groupe de Hugues Gascan (Derouet *et al*, 2004). C'est la troisième cytokine, en plus du CNTF et de CLC/CLF, connue pour utiliser le récepteur tripartite au CNTF. Chez la souris, la neuropoïétine est

exprimée uniquement pendant le développement embryonnaire dans le cerveau (Derouet *et al*, 2004). De plus, l'expression embryonnaire de la neuropoïétine et de CNTFR, mais pas de CLC et CNTF, coïncident et ceci peut indiquer qu'une signalisation déficiente de la neuropoïétine pourrait partiellement contribuer au phénotype périnatal léthal observé dans les souris  $\text{CNTFR}\alpha^{-/-}$ . Curieusement, le gène humain codant pour la neuropoïétine contient une délétion de 8 nucléotides dans le troisième exon engendrant un décalage du cadre de lecture, ainsi le gène humain de la neuropoïétine serait un pseudogène (Derouet *et al*, 2004).

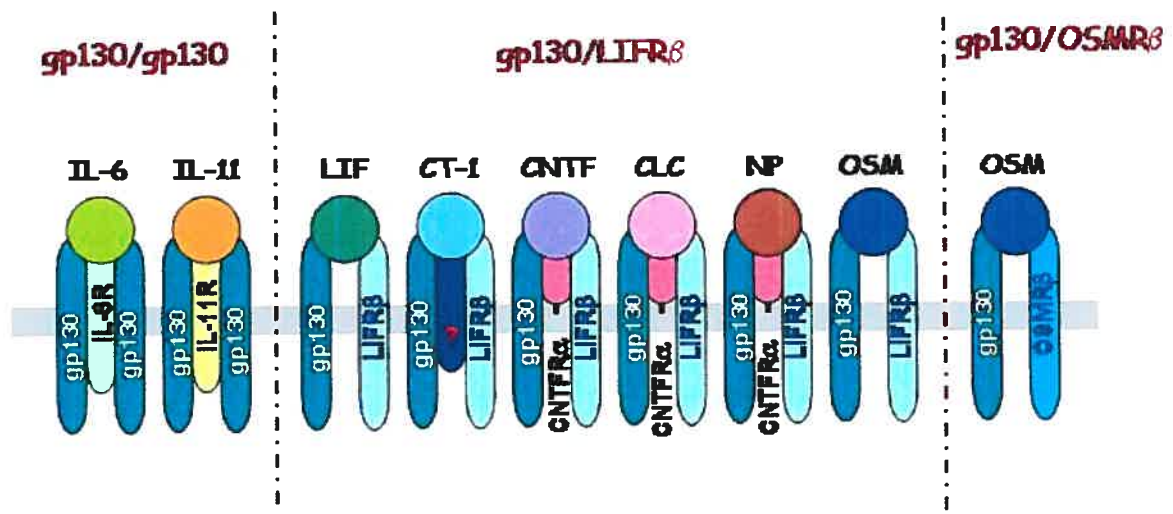
Mes travaux de recherche ont porté dans un premier temps sur l'élaboration d'une souris Knock-In inductible dans le but d'étudier le rôle de CLC dans le développement des systèmes nerveux et immunitaires. Parallèlement, nous nous sommes intéressés au rôle autocrine de CLC dans le cancer du sein. Et enfin, nous avons étudié de façon plus précise les voies de signalisation empruntées par la neuropoïétine.

# Chapitre 1. Les récepteurs de la famille gp130 et leurs voies de signalisation

## I. La famille des cytokines gp130 et leurs récepteurs

### A. Généralités : Cytokines et récepteurs

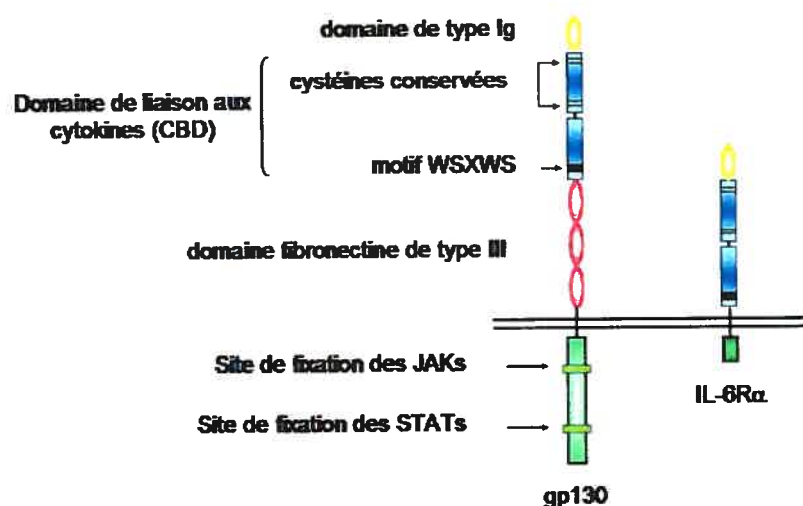
La famille des cytokines gp130 comprend l'interleukine (IL)-6, l'IL-11, le « leukemia inhibitory factor » (LIF), l'oncostatine M (OSM), la cardiotrophine-1 (CT-1), le « ciliary neurotrophic factor » (CNTF), la « Cardiotrophine-like cytokine » (CLC) (ou NNT-1/BSF-3) et la neuropoïétine. Les sous-unités réceptrices impliquées dans la reconnaissance des cytokines de cette famille peuvent être divisées en deux groupes : les sous unités non transductrices du signal, appelées chaîne alpha : IL-6Ra, IL-11Ra et CNTFRa, et les sous-unités transductrices du signal, appelées chaîne bêta : gp130, LIFRβ et OSMRβ (Figure 1).



**Figure 1 : Représentation schématique des récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6.** Ces complexes récepteurs induisent un signal grâce à plusieurs combinaisons de sous-unités réceptrices (gp130, LIFRβ et OSMRβ). La chaîne gp130 est utilisée par tous les membres de la famille. D'après (Heinrich *et al*, 2003)

Toutes les cytokines recrutent la sous-unité réceptrice commune gp130 et une sous-unité réceptrice spécifique. Plusieurs cytokines de cette famille induisent la formation d'hétérodimères entre gp130 et LIFRβ comme le LIF, l'OSM

humaine, la CT-1, le CNTF et CLC. Dans le cas de CLC et du CNTF, le récepteur tripartite final inclut une sous-unité réceptrice spécifique du ligand : le CNTFR $\alpha$ . L'ensemble de ces récepteurs sont membres de la famille des récepteurs hématopoïétiques de classe I, qui sont caractérisés par un domaine de liaison aux cytokines ou domaine CBD (Cytokine Binding Domain) formé de deux modules fibronectine de type III liés entre eux par une séquence riche en proline (Bazan, 1990). Ces récepteurs de classe I contiennent quatre résidus cystéines conservés dans le domaine fibronectine III N-terminal du CBD formant des ponts disulfures intramoléculaires et une séquence conservée « WSXWS » dans le module fibronectine III C-terminal (Figure 2).



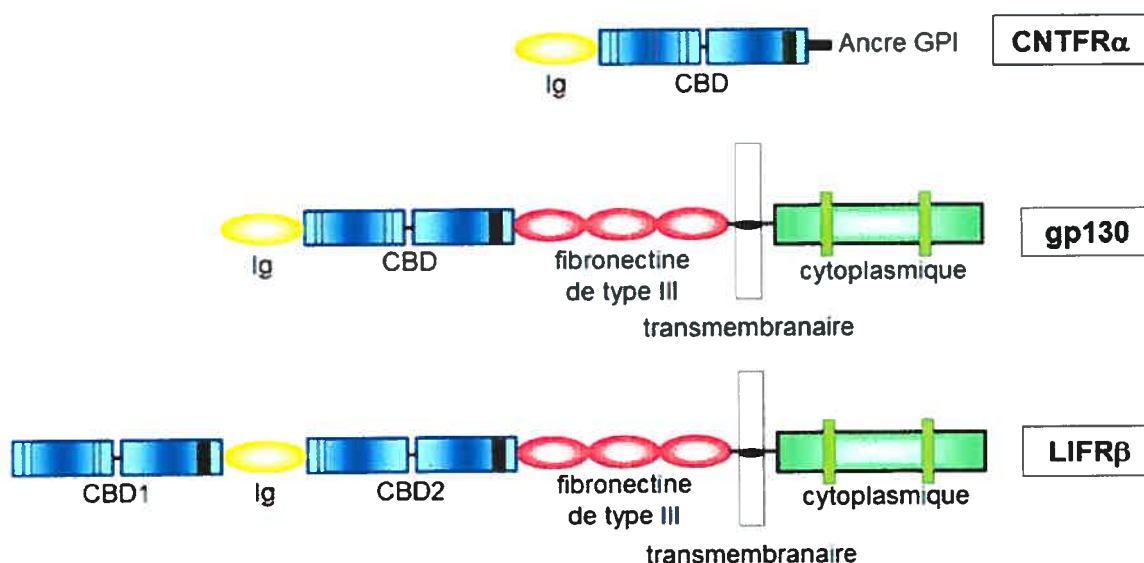
**Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un récepteur de cytokine de type I : exemple du récepteur de haute affinité de l'IL-6.**

## B. Le récepteur au CNTF

### 1. Structure

Le récepteur au CNTF est un récepteur membranaire multimérique (Davis *et al*, 1991). La sous-unité réceptrice de fixation du CNTF, le CNTFR $\alpha$ , présente des homologies structurales avec le récepteur de l'IL-6 (IL-6R $\alpha$ ). En particulier, il possède deux ponts cystéines dont les positions sont conservées, et la présence du motif « WSXWS » retrouvé dans la quasi-totalité des récepteurs aux cytokines.

Le CNTFR $\alpha$  contient en position N-terminal un domaine « immunoglobulin-like » et un domaine de liaison aux cytokines (domaine CBD). Le récepteur fonctionnel pour le CNTF comprend, outre le CNTFR $\alpha$ , la chaîne de transduction gp130 commune à l'ensemble des cytokines de la famille de l'IL-6, et la chaîne de transduction  $\beta$  correspondant au récepteur du LIF, le LIFR $\beta$  (Davis *et al*, 1993b). Le CNTFR $\alpha$ , de poids moléculaire de 72 kDa, est un récepteur principalement extra-membranaire. Contrairement au récepteur de l'IL-6, ce récepteur est ancré dans la membranaire cellulaire par l'intermédiaire d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Le récepteur au LIF (LIFR) présente une organisation similaire à gp130 avec un domaine CBD en N-terminal supplémentaire (Figure 3).



**Figure 3 : Représentation schématique des structures modulaires de CNTFR $\alpha$ , gp130 et LIFR $\beta$ .** Les domaines CBD (Cytokine Binding Domain) contiennent respectivement les deux cystéines conservées (indiquées par une double ligne) et le motif WSXWS (indiqué par une ligne épaisse) qui sont caractéristiques de ces molécules (Man *et al*, 2003).

L'expression membranaire du CNTFR $\alpha$  confère au récepteur tripartite une sélectivité et une spécificité de liaison pour ses ligands. La fixation du ligand sur le récepteur fonctionnel va engendrer des modifications structurales des chaînes réceptrices avec notamment un contact et une dimérisation des chaînes de signalisation gp130 et LIFR $\beta$  qui vont amorcer les cascades de transduction du signal et amener l'information vers le noyau (Davis *et al*, 1993b).

L'ancrage glycolipidique du CNTFR $\alpha$  dans la membrane peut être clivé par une phospholipase pour donner une forme soluble de CNTFR $\alpha$ . Celui-ci reste capable de lier le ligand, et l'association de CNTF/CNTFR $\alpha$  soluble va pouvoir ensuite activer les cellules exprimant les sous-unités réceptrices gp130 et LIFR $\beta$  en absence du CNTFR $\alpha$  membranaire (Davis *et al*, 1993a).

## **2. Profil d'expression et phénotype des souris CNTFR $\alpha$ <sup>-/-</sup>**

Le CNTFR $\alpha$  a été cloné en 1991 par le groupe de Davis (Davis *et al*, 1991). CNTFR $\alpha$  est essentiellement exprimé dans le tissu neural au niveau des neurones. En dehors du système nerveux central, une expression relativement forte a été détectée au niveau des cellules des muscles squelettiques, et une expression plus modérée a été visualisée au niveau de la glande surrénale, du nerf sciatique, de la peau, du foie, des testicules et des reins (Davis *et al*, 1991) (Ip and Yancopoulos, 1992).

L'inactivation du gène codant pour le CNTFR $\alpha$  chez la souris conduit à un phénotype très sévère avec la mort périnatale des animaux. Les souriceaux ne peuvent se nourrir et présentent un déficit important au niveau des populations de neurones moteurs (DeChiara *et al*, 1995).

## **3. Les ligands du CNTFR**

A l'heure actuelle, trois ligands ont été décrits pour le récepteur au CNTF. Le premier ligand est le facteur neurotrophique CNTF. En 2000, le complexe CLC/CLF a été décrit comme étant le second ligand du CNTFR (Elson *et al*, 2000), et enfin, en 2004, la neuropoïétine a été découverte comme un troisième ligand de ce récepteur (Derouet *et al*, 2004). Ces différents ligands seront largement détaillés dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

## **II. Les voies de signalisation**

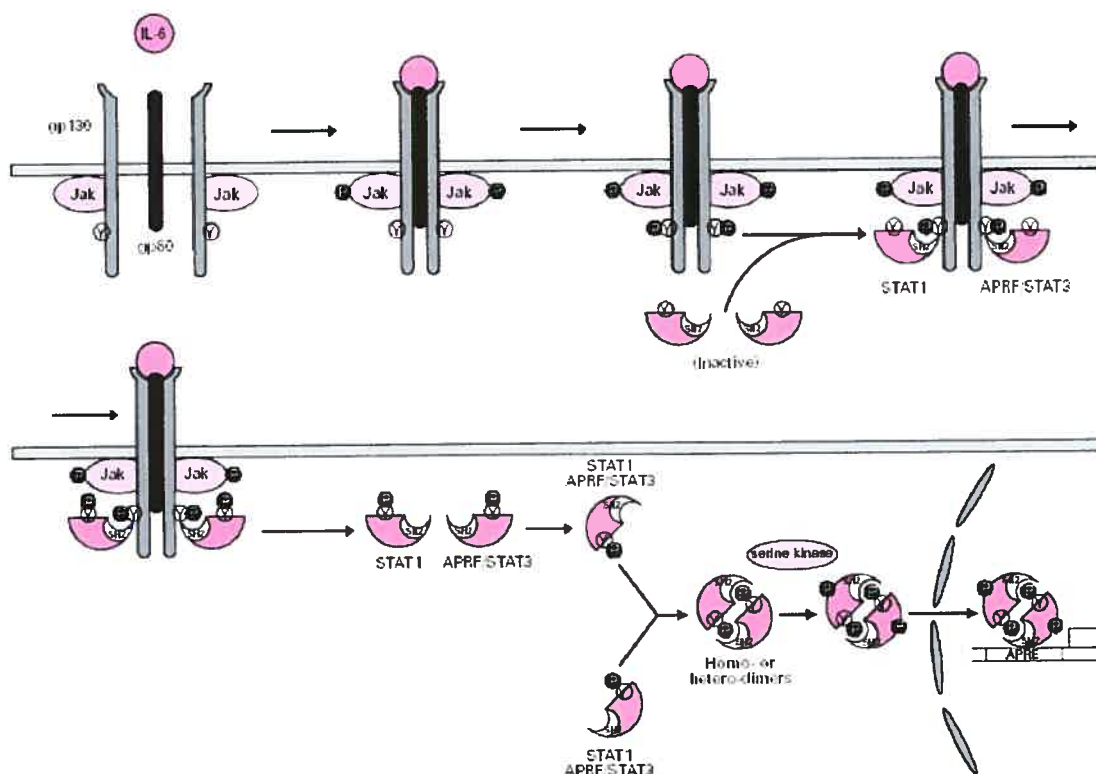
### **A. La voie de signalisation JAK-STAT**

La voie de transduction majeure des cytokines de la famille gp130 est la cascade de signalisation impliquant les Janus Kinases (JAKs) et les Transducteurs du Signal et Activateurs de Transcription (STATs). La voie de signalisation JAK-STAT a été décrite par de nombreuses équipes (Naka *et al*, 2002);(Heinrich *et al*, 2003).

#### **1. Mécanisme général de transduction du signal activé par un complexe cytokine/récepteur.**

La fixation d'une cytokine sur son complexe récepteur permet l'activation de la signalisation intracellulaire. La liaison du ligand mène à un changement conformationnel dans le complexe récepteur qui induit rapidement l'activation des tyrosines kinases qui lui sont associées, kinases de la famille des JAKs. Les JAKs activées phosphorylent les résidus tyrosine spécifiques dans les domaines cytoplasmiques du récepteur qui entraînent, entre autre, le recrutement des facteurs STATs. A la suite de la liaison au récepteur, les facteurs STATs sont très rapidement phosphorylés par les JAKs. La formation d'homo ou d'hétérodimères de protéines STATs résulte de l'association entre les résidus tyrosine phosphorylés et le domaine SH2 de ces facteurs. Les dimères sont activement transloqués dans le noyau et régulent la transcription des gènes dépendants des STATs (Figure 4).





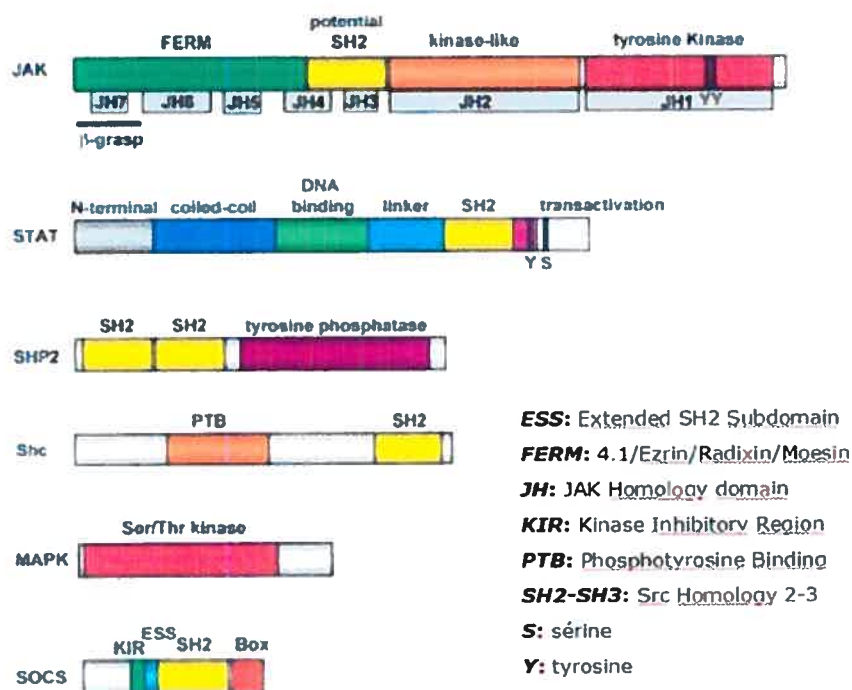
**Figure 4 : Signalisation de l'IL-6 via la voie de signalisation JAK-STAT.** D'après (Heinrich *et al*, 1998).

## 2. Les « Janus Kinases »

Les « Janus Kinases » (JAKs) sont des protéines cytoplasmiques à activité tyrosine kinase dont le poids moléculaire varie entre 120 et 140 kDa. Elles sont actuellement au nombre de quatre: JAK1, JAK2 et Tyk2 qui sont exprimées de façon ubiquitaire, et JAK3 qui est principalement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique (Ihle and Kerr, 1995). Bien que JAK1, JAK2 et Tyk2 lient les sous-unités transductrices du signal gp130, LIFR $\beta$  et OSMR $\beta$ , JAK1 semble être principalement impliquée dans la signalisation des cytokines gp130 (Lutticken *et al*, 1994; Narazaki *et al*, 1994; Stahl *et al*, 1995). Ces protéines sont constituées de différents domaines et en particulier d'un domaine tyrosine kinase, le domaine C-terminal JH1 (JAK Homology domain-1), qui est caractérisé par deux résidus tyrosine conservés nécessaires à l'activité enzymatique du domaine (Figure 5). La mutation des deux résidus tyrosine (Tyr1054 et Tyr1055) par des

phénylalanines dans la molécule Tyk2 entraîne une inactivation de la protéine. La mutation ponctuelle d'une des deux tyrosines (Tyr1007) dans la molécule JAK2 conduit également à une très forte diminution de l'activité tyrosine kinase de cette protéine. Le domaine JH1 est précédé d'une région JH2 ou «kinase like domain» (domaine pseudo-kinase), dont le rôle n'est pas clairement établi. Cependant, il semblerait que ce domaine régule négativement la fonction des protéines JAKs (Lutticken *et al*, 1994; Narazaki *et al*, 1994; Stahl *et al*, 1995).

Les JAKs peuvent se lier de façon constitutive à la partie distale intracellulaire des récepteurs par leurs domaines JH3 à JH7 situés dans la région N-terminale de ces protéines (Stahl *et al*, 1995; Heinrich *et al*, 1998) (Figure 5). En effet, dans cette région du récepteur ont été identifiés deux motifs conservés, appelés "boîtes" 1 et 2 (Murakami *et al*, 1991). La "boîte 1" est un motif riche en proline et la "boîte 2" est caractérisée par deux groupes d'acides aminés hydrophobes et basiques. La proximité des domaines intracellulaires des récepteurs permet l'activation des JAKs, induite par une trans-phosphorylation des deux tyrosines conservées dans le domaine JH1. Cette étape déclenche l'activité catalytique de ces kinases qui vont ensuite phosphoryler de façon croisée des résidus tyrosine conservés ("boîte 3") sur les domaines intracellulaires des récepteurs (Murakami *et al*, 1993; Ihle and Kerr, 1995; Haan *et al*, 2002). Les tyrosines phosphorylées dans le récepteur constituent des sites d'ancrage pour différentes protéines de la signalisation et aussi pour les facteurs de transcription de la famille STAT au niveau de la boîte 3 (Stahl *et al*, 1995). Les cytokines de la famille de l'IL-6 activent préférentiellement JAK1, mais également JAK2 et Tyk2.



**Figure 5 : Organisation structurale des composants de la voie de signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6.** Les résidus tyrosine et sérine importants dans la phosphorylation sont indiqués. D'après (Heinrich *et al*, 2003).

Le phénotype des souris déficientes pour JAK1 (Rodig *et al*, 1998), pour JAK2 (Neubauer *et al*, 1998; Parganas *et al*, 1998), est létal alors que les souris déficientes pour Tyk2 ne présentent pas d'anomalies développementales évidentes (Karaghiosoff *et al*, 2000; Shimoda *et al*, 2000). En revanche, en 2006, l'équipe de Minegishi *et al* a identifié un patient possédant une mutation homozygote sur le gène de Tyk2 entraînant une absence de protéine fonctionnelle. Ce patient a été diagnostiqué avec un syndrome d'hyper-IgE, montrant une susceptibilité anormale pour divers microorganismes (virus, champignons et mycobactéries). Il souffre de dermatite atopique avec un taux élevé d'IgE. Ce patient présente des dysfonctions dans plusieurs voies de signalisation activées par les cytokines dont l'IL6. Cette déficience montre que Tyk2 joue un rôle important dans la signalisation impliquée dans l'immunité innée et acquise chez l'humain (Minegishi *et al*, 2006).

### **3. Les STATs ou « Signal Transducers and Activators of Transcription »**

Les « Signal Transducers and Activators of Transcription » (STATs) sont des protéines intracellulaires d'un poids moléculaire apparent de 85 kDa. Elles sont actuellement au nombre de sept : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6. L'expression de STAT4 est plus restreinte aux cellules d'origine myéloïde et testiculaire, mais les autres membres de la famille sont exprimés de façon ubiquitaire (Zhong *et al*, 1994). Les membres de cette famille de protéine présentent différents domaines conservés (Figure 5). Ils possèdent en N-terminal, un domaine d'oligomérisation, un domaine de type "coiled-coil", un domaine de liaison à l'ADN et un domaine SH3. L'extrémité C-terminale est constituée d'un domaine SH2 et d'un domaine de transactivation. Un résidu tyrosine, situé dans ce dernier domaine et conservé dans toutes les STATs, est phosphorylé après leur activation (Heinrich *et al*, 1998). Les deux parties C et N-terminales sont reliées entre elles par un domaine en boucle. Le domaine SH2 permet la fixation de ces STATs sur les tyrosines phosphorylées des récepteurs. Les STATs liées aux domaines intracellulaires du récepteur sont ensuite phosphorylées par les JAKs sur le résidu tyrosine conservé en C-terminal. Cette activation entraîne un changement de conformation qui permet la libération des STATs du récepteur. Ces protéines vont ensuite s'homo- ou s'hétérodimériser par fixation du domaine SH2 de l'une sur la tyrosine phosphorylée de l'autre et réciproquement (Shuai *et al*, 1994), ce qui permet leur activation. Les différentes familles de récepteurs sont associées à certaines STATs, ce qui leur confère leurs spécificités d'action. La protéine STAT3 est principalement impliquée dans la signalisation de gp130 et du LIFR $\beta$  mais avec une moindre importance, les facteurs STAT1 et STAT5 jouent également un rôle (Paonessa *et al*, 1995).

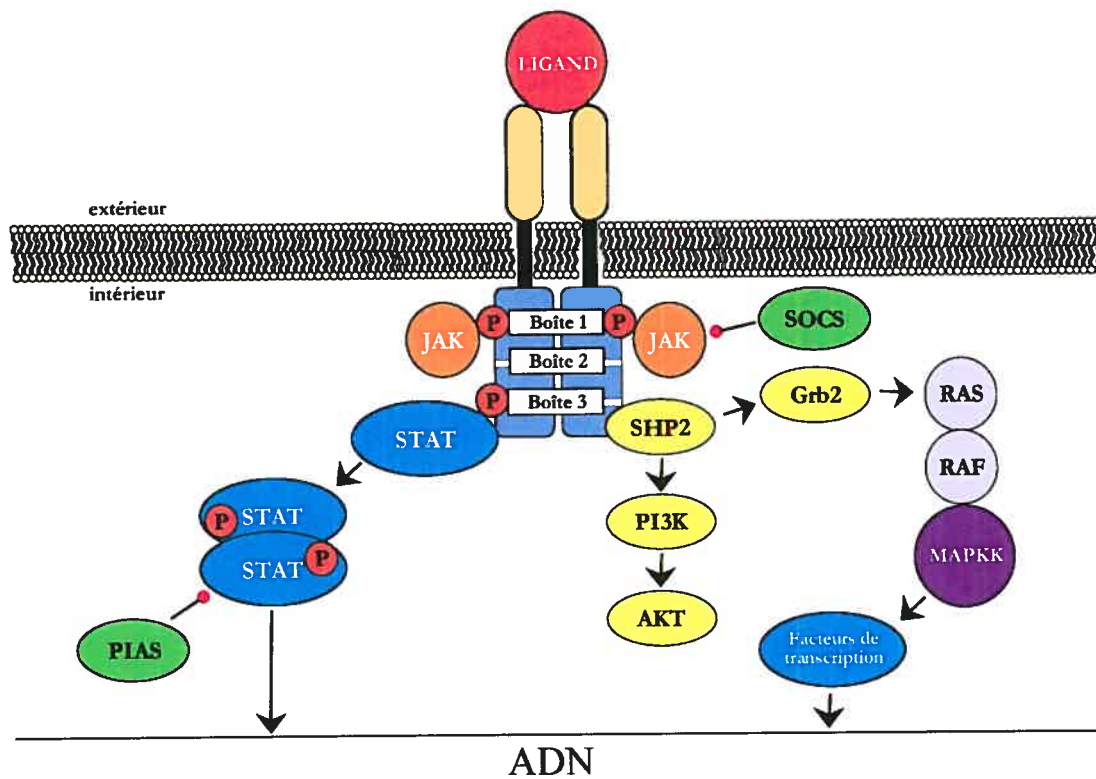
La dimérisation des STATs permet leur translocation dans le noyau par un mécanisme impliquant des complexes d'importines au niveau des pores nucléaires. En effet, ce dimère s'associe à des protéines appartenant à la famille des karyopherines- $\beta$  dont font partie les importines. Ces protéines vont assurer la translocation dans le noyau (Heinrich *et al*, 2003; Reich and Liu, 2006). Une fois dans le noyau, ces dimères peuvent ensuite se fixer sur des séquences consensus de type GAS (TTN5AA) via leurs domaines de liaison à l'ADN et réguler la

transcription de gènes cibles situés en aval (Akira *et al*, 1994; Zhang *et al*, 1995). La nature des gènes cibles pourrait dépendre de la composition du dimère de STATs. En effet, elles peuvent réguler la transcription de gènes variés comme, par exemple, les gènes codant pour les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, certains facteurs de transcription (jun-B, c-fos, IRF-1), des protéines telles que le « vasoactive intestinal peptide » (VIP), les « heat shock protein » (HSP) et la protéine gp130 (O'Brien and Manolagas, 1997; Heinrich *et al*, 1998).

La voie JAK/STAT est la voie de signalisation majoritaire pour les cytokines de la famille de l'IL-6, cependant, ces protéines peuvent également initier l'activation d'autres voies de signalisation intracellulaire.

## **B. Les protéines adaptatrices et la famille des MAP kinases**

Deux tyrosines (Tyr759 et Tyr974) phosphorylées par les JAKs sur les domaines intracellulaires de gp130 et du LIFR $\beta$  respectivement, sont des sites d'ancrage pour la protéine SHP-2 qui est une protéine phosphatase ubiquitaire (Boulton *et al*, 1994; Kumar *et al*, 1994). Lorsque SHP-2 interagit avec les domaines intracellulaires des différents récepteurs, cette protéine va être phosphorylée par les JAKs. Elle va ensuite recruter la protéine adaptatrice « growth factor receptor bound protein 2 » (Grb2) et la protéine « SOS » (Figure 6). Par phosphorylation, ces protéines activent à leur tour les protéines Ras et Raf qui vont phosphoryler les « mitogen activated protein kinase kinase » (MAPKK). Les MAPKKs phosphorylent ensuite les « mitogen activated protein kinase » (MAPK) (ERK1 et ERK2) (Chang and Karin, 2001). Ces protéines peuvent ensuite activer la transcription des gènes de la réponse immédiate comme c-fos et jun-B dans le noyau et des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Heinrich *et al*, 1998; Zauberman *et al*, 1999; Heinrich *et al*, 2003). L'activation des MAPKs induit la survie cellulaire (Gotoh *et al*, 1996; Gotoh *et al*, 1997).



**Figure 6 : Voies de signalisation induites par les cytokines de la famille de l'IL-6.**

### **C. La voie de la « Phosphatidyl Inositol 3 Kinase »**

La protéine SHP-2 phosphorylée est également capable de recruter la voie de la « Phosphatidyl Inositol 3 Kinase » (PI3K) (Figure 6). Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire et présente un poids moléculaire de 65 kDa (Heinrich *et al*, 1998). Elle est constituée de deux domaines SH2 situés en position N-terminale et d'un domaine tyrosine phosphatase en C-terminal. SHP-2, via la protéine adaptatrice Grb2, active Gab1 qui phosphoryle alors la sous-unité catalytique p85 de la PI3K. La PI3K est ainsi capable de recruter la protéine Akt impliquée dans la survie et/ou la prolifération cellulaires.

### **D. La régulation négative de la signalisation intracellulaire**

L'activation des différentes voies de signalisation cellulaire est généralement transitoire ce qui suggère l'existence de mécanismes entraînant l'inactivation de ces protéines et permettant un retour à l'état initial.

## **1. Les PIAS ou « protein inhibitory of activated STAT »**

Les « protein inhibitor of activated STAT » (PIAS) ont été initialement identifiées comme des régulateurs négatifs des STAT. La famille des PIAS comprend PIAS1, PIAS3, PIASx (aussi connue comme PIAS2) et PIASy (aussi connue comme PIAS4) (Shuai and Liu, 2005). Excepté pour PIAS1, deux isoformes de chaque protéine PIAS ont été identifiées. Les protéines PIAS possèdent une activité de « small ubiquitin-like modifier (sumo)-E3-ligase ». Il existe plus de 60 protéines, la plupart étant des facteurs de transcription, qui sont régulées soit de façon positive soit de façon négative par cette famille de protéines à travers de multiple mécanismes. Par exemple, la protéine PIAS3, constitutivement exprimée dans les tissus humains, bloque l'activité spécifique des protéines STAT3 en interagissant avec leurs résidus tyrosine phosphorylés, ce qui empêche la fixation de ce facteur de transcription sur l'ADN (Chung *et al*, 1997) (Figure 7). PIAS1 a une activité similaire pour STAT1 (Liu *et al*, 1998). Les PIAS peuvent également recruter d'autres co-régulateurs tels que les histones déacétylases pour réprimer la transcription. Elles peuvent aussi inhiber la transcription en entraînant la sumoylation des facteurs de transcription. Enfin, le dernier mécanisme d'inhibition est la séquestration des facteurs de transcription dans certaines structures subnucléaires qui sont enrichies en complexe co-répresseurs (Shuai and Liu, 2005).

## **2. Les protéines SOCS et leur fonction**

La famille de protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signalling) a été décrite pour la première fois en 1997 et a été aussi appelée SSI pour « STAT-inducible STAT-inhibitors », JAB pour « Janus Kinase Binding protein » et CIS pour « Cytokine-Inducible SH2 protein ». Ces protéines sont des inhibiteurs de la signalisation intracellulaire induite par les cytokines (Nicholson and Hilton, 1998; Alexander *et al*, 1999b). Contrairement aux protéines PIAS exprimées de façon constitutive dans les cellules, l'expression des SOCS est induite après la stimulation des cellules avec différentes cytokines (Figure 7). En effet, les promoteurs des gènes de SOCS peuvent contenir des sites de fixation des STATs (Naka *et al*, 1997). La famille des protéines SOCS compte huit membres (SOCS-1 à SOCS-7 et CIS) avec une similarité structurale des protéines. Toutes les SOCS

contiennent une région N-terminale variable, un domaine SH2 central, un domaine C-terminal appelé « SOCS-box motif » et pour certaines un domaine KIR pour « kinase inhibitory region » (Figure 5).

SOCS-1 et SOCS-3 sont les membres les plus efficaces de cette famille et inhibent la cascade de signalisation JAK-STAT de différentes cytokines et facteurs de croissance tels que les cytokines de la famille gp130, les hormones de croissance, la prolactine et la leptine. Plusieurs mécanismes d'inhibition de la voie JAK-STAT par les SOCS ont été suggérés. CIS peut s'associer à la tyrosine phosphorylée des domaines intracellulaires du récepteur qui permet le recrutement de STAT5 et empêcher sa fixation. SOCS-1 et SOCS-3 sont généralement liés à la famille de l'IL-6. Ces deux protéines peuvent inhiber les JAKs et donc diminuer l'état de phosphorylation des domaines intracellulaires pour le recrutement des STATs. SOCS-1 lie les régions SH2 et N-terminal du domaine catalytique JH1 de JAK2 et ainsi inhibe l'activité de JAK2. Comme SOCS-1, SOCS-3 s'associe à JAK2. De plus, SOCS-3 peut aussi s'associer avec la phosphotyrosine 759 de gp130 et empêcher la fixation de SHP-2 (Nicholson *et al*, 2000; Schmitz *et al*, 2000; De Souza *et al*, 2002). De plus, le complexe « elongin BC » pourrait lier le motif SOCS-box permettant ainsi la construction du complexe ubiquitine ligase E3 qui induit la polyubiquitination et la dégradation protéosomale des substrats liés aux protéines SOCS (Zhang *et al*, 1999a). Des expériences de transgénèse et d'inactivation du gène SOCS-3 ont montré que cette protéine est un inhibiteur crucial dans l'érythropoïèse du foie fœtal, puisque les animaux meurent avant la naissance d'une érythrocytose marquée et d'un blocage de l'érythropoïèse (Marine *et al*, 1999).

### **3. Les protéines tyrosine phosphatases**

La protéine SHP-2, qui est fixée aux domaines intracellulaires des récepteurs par différentes tyrosines phosphorylées, peut être à son tour phosphorylée sur les résidus tyrosine 542 et/ou 580, ce qui permet l'activation de cette protéine. En effet, ces phosphotyrosines vont interagir avec les domaines SH2 de cette protéine et induire un changement de conformation qui va permettre l'activation du domaine tyrosine phosphatase C-terminal. SHP-2 va ainsi déphosphoryler les résidus tyrosine du domaine intracellulaire des chaînes



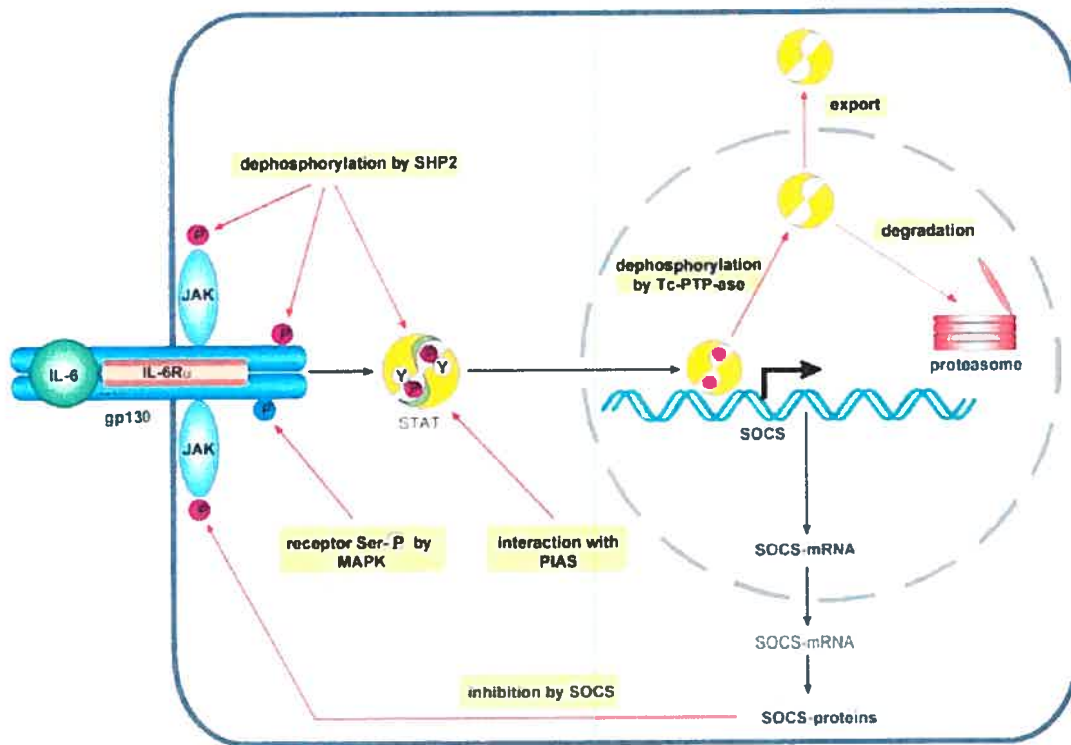
transductrices du signal, ainsi que des protéines JAKs et STATs. En résumé, SHP-2 peut donc réguler positivement la signalisation intracellulaire en activant les voies des MAP kinases et de la PI3 kinase et exercer un rétrocontrôle négatif en tant que tyrosine phosphatase (Heinrich *et al*, 2003).

#### **4. Autres systèmes de régulation négative de la transduction du signal**

Un autre rétrocontrôle des récepteurs de la famille de l'IL-6 provient de l'internalisation du complexe récepteur/cytokine après son interaction avec son ligand. Ainsi, la fixation de l'IL-6 sur son récepteur hexamérique va progressivement entraîner une diminution de l'expression du récepteur fonctionnel à la surface cellulaire. Ce mécanisme de régulation négative fait intervenir le domaine intracellulaire de gp130. Les complexes cytokine/récepteur peuvent être dégradés par la voie lysosomale (Wang and Fuller, 1994; Dittrich *et al*, 1996). La voie du protéasome pourrait également être impliquée dans la régulation négative du signal intracellulaire. Après stimulation cellulaire à l'OSM, les chaînes gp130, LIFR $\beta$  et OSMR $\beta$  sont ubiquitinyllées et dégradées par la voie du protéasome (Blanchard *et al*, 2001). Cette voie permettrait alors de réguler la durée du signal intracellulaire en diminuant le nombre de récepteurs à la surface cellulaire.

Un autre système de régulation de la voie de signalisation est la présence de phosphatases nucléaires qui déphosphorylent les dimères de STATs. En effet, des résultats récents ont montré la présence de phosphatases nucléaires nommées Tc-PTP (T-cell Protein Tyrosine Phosphatase) impliquées dans la régulation de la signalisation induite par l'IL-6 (Yamamoto *et al*, 2002).

La figure 7 représente les différents mécanismes de rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation JAK-STAT détaillés précédemment.



**Figure 7 : Mécanismes de régulation négative dans la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6 (Heinrich *et al*, 2003).**

La découverte de ces protéines agissant à différents niveaux de la cascade d'activation intracellulaire laisse entrevoir la complexité et la finesse de ce réseau de régulation. Il est probable qu'un équilibre entre activation et inactivation du signal soit à l'origine de la précision de la réponse biologique d'une cellule suite à son activation par des cytokines. La réponse optimale à une cytokine s'observe en effet dans des cellules préalablement sevrées, alors que la présence continue du même facteur provoque une réponse moindre (désensibilisation). Une conséquence de ces observations est que l'administration de cytokines à des fins thérapeutiques devrait être plus efficace par traitement discontinu plutôt que continu (Gisselbrecht, 1999).

## **Chapitre 2. Les ligands du récepteur au CNTF**

### **I. Le CNTF, une cytokine gliale au secours des neurones**

Parmi les protéines identifiées par leur capacité à protéger les neurones, le ciliary neurotrophic factor (CNTF) occupe une place privilégiée, ayant déjà été utilisé dans plusieurs essais cliniques concernant la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Huntington. Le CNTF est synthétisé abondamment chez l'adulte par deux populations de cellules gliales, les astrocytes et les cellules de Schwann. Son récepteur trimérique est principalement présent sur les neurones et les fibres musculaires. Pourtant, dans certaines conditions, le CNTF peut affecter bien d'autres types cellulaires. Les fonctions physiologiques du CNTF sont également difficiles à cerner puisque son absence, chez des souris génétiquement modifiées, comme chez l'homme, ne provoque que des effets modestes sur les neurones (Masu *et al*, 1993; Takahashi *et al*, 1994). Enfin, malgré ses effets neuroprotecteurs largement démontrés chez l'animal, les résultats des essais cliniques utilisant le CNTF sont jusqu'à maintenant demeurés négatifs, davantage en raison du mode d'administration et des effets secondaires que de la molécule elle-même.

#### **A. Structure, expression et synthèse du CNTF**

Le CNTF est une protéine acide de 22 kDa, constituée d'un ensemble de quatre hélices  $\alpha$  en position antiparallèle, dont la particularité est l'absence de peptide signal dans la séquence primaire (Lin *et al*, 1989; Stockli *et al*, 1989). Le CNTF reste donc dans le cytoplasme des cellules gliales qui le produisent, et pourrait être libéré lors de lésions et ainsi serait un « facteur traumatique ». La localisation du CNTF se restreint à des cellules non neuronales du système nerveux périphérique (SNP), les cellules de Schwann et du système nerveux central (SNC), les astrocytes (Stockli *et al*, 1991; Friedman *et al*, 1992). Cette hypothèse de facteur traumatique semble être confirmée par l'analyse du phénotype de souris inactivée pour le gène du CNTF (Masu *et al*, 1993). Ces animaux sont viables et ne présentent qu'une dégénérescence de certaines populations de motoneurones, ce qui entraîne une légère diminution de leurs

forces musculaires (Guillet *et al*, 1999). De plus, on a identifié, dans 2,3 % de la population humaine, une mutation homozygote inactivant le gène du CNTF. Or, les patients homozygotes ne présentent pas de troubles neurologiques particuliers (Takahashi *et al*, 1994).

L'ARN messager du CNTF, ainsi que la protéine, sont détectés lors de la première semaine postnatale, et leurs taux augmentent rapidement pour atteindre un plateau à l'âge adulte (Stockli *et al*, 1991). Les concentrations les plus élevées de CNTF s'observent dans les gaines des axones des nerfs périphériques, dans lesquelles seules les cellules de Schwann expriment le gène (Gupta *et al*, 1992). Ces taux de CNTF «périphérique» sont extrêmement importants puisque l'on a calculé qu'ils représentaient des concentrations 1000 fois plus élevées que celles nécessaires à une activité biologique de 50 %, si le CNTF était distribué de façon homogène. Dans le SNC, le CNTF est produit en concentration plus faible, mais de façon quasi-ubiquitaire (Stockli *et al*, 1991). La seule cellule dans laquelle s'exprime le gène du CNTF est l'astrocyte, cellule de la macroglie d'origine ectodermique (Stockli *et al*, 1991). Le mode de sécrétion du CNTF demeure énigmatique. En effet, sa présence n'est pas détectable dans les milieux de culture d'astrocytes ou de cellules de Schwann purifiés, et le CNTF reste séquestré dans les cellules qui le produisent, même en présence de stimulus qui accroissent ses concentrations intracellulaires. Cependant, la molécule devant atteindre l'espace extracellulaire pour agir sur ses cellules cibles, une partie de la fraction intracellulaire est nécessairement exportée à l'extérieur de la cellule. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant cette libération, qui, en l'absence d'une séquence peptide signal, ne peut pas utiliser les voies connues de l'exocytose. L'hypothèse la plus ancienne, et la plus largement acceptée aujourd'hui, propose que le CNTF ne serait libéré qu'après lyse de la cellule lors de lésions tissulaires (Thoenen, 1991; Sendtner *et al*, 1997) et jouerait donc un rôle de « facteur traumatique », également mis en exergue par ses capacités neuroprotectrices. Cette hypothèse a cependant toujours eu ses détracteurs, ne serait-ce que sur la base d'un raisonnement «d'économie biologique» selon lequel il serait extrêmement étonnant que tous les astrocytes et toutes les cellules de Schwann soient amenés à synthétiser en permanence une molécule dont le seul

rôle physiologique serait lié à leur propre mort dans des conditions de lyse, phénomène en l'occurrence extrêmement rare.

D'autres hypothèses examinées se fondent sur l'existence de modes de sécrétion originaux, identifiés pour d'autres molécules ne possédant pas de peptide signal, telles que le bFGF (basic fibroblast growth factor) ou l'IL-1 $\beta$  (Rubartelli *et al*, 1990; Florkiewicz *et al*, 1995) et suggèrent l'existence d'un processus du même ordre pour le CNTF (Monville and Peschanski, 2001). L'utilisation de transporteurs appartenant à la famille des protéines ABC (ATP binding cassette), telle que la P-glycoprotéine (P-gp), une pompe entraînant notamment l'efflux constant des drogues cytotoxiques, a ainsi été suggérée. Cette molécule, impliquée classiquement dans la résistance multiple aux drogues anti-cancéreuses, est en effet présente à la membrane des astrocytes (Pardridge *et al*, 1997), et même contrôlée de façon positive en réponse à une lésion neuronale (Zhang *et al*, 1999b), c'est-à-dire lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire du CNTF. Enfin, le mécanisme récemment mis en évidence pour CLC, qui est le second ligand du récepteur au CNTF, est l'hétérodimérisation d'une protéine non sécrétée avec un récepteur soluble à l'intérieur de la cellule, qui forme un complexe pouvant être sécrété (Elson *et al*, 2000). Toutes ces hypothèses, alternatives à celle du « facteur traumatique », nécessitent d'être validées par la mise en évidence de la sécrétion du CNTF dans des cultures de cellules.

Chez le rat et la souris, le gène codant pour le CNTF ne semble pas exprimé au cours du développement intra-utérin (Li *et al*, 1996). Cette absence a longtemps été une énigme supplémentaire car, si l'invalidation du gène codant pour le CNTF chez la souris ne provoque pas de désordres développementaux identifiables (Masu *et al*, 1993), il n'en est pas de même de celle du gène qui code pour la sous-unité  $\alpha$  de son récepteur (DeChiara *et al*, 1995).

## **B. Récepteur et signalisation**

Le récepteur du CNTF est formé de trois sous-unités, deux sous-unités  $\beta$ , gp130 et LIFR $\beta$  – protéines transmembranaires formant le récepteur dimérique du LIF – et une sous-unité CNTFR $\alpha$ , dite « spécifique » (Davis *et al*, 1991). Contrairement aux deux sous-unités  $\beta$ , qui sont relativement ubiquitaires,

l'expression de cette sous-unité spécifique est restreinte aux tissus nerveux et au muscle squelettique (Davis *et al*, 1991; Ip and Yancopoulos, 1992). A l'inverse du CNTF, CNTFR $\alpha$  est présent dès la vie embryonnaire. Le CNTF, après s'être associé à son récepteur spécifique, recrute la sous-unité gp130, responsable de la transduction du signal, pour former un complexe inactif, puis la sous-unité LIFR $\beta$ . La dimérisation des sous-unités  $\beta$  permet le déclenchement du signal (Davis *et al*, 1993b).

De façon intéressante, lorsqu'il est présent en forte quantité, le CNTF de rat peut transduire un signal via le seul récepteur dimérique du LIF humain (gp130-LIFR $\beta$ ) en l'absence de CNTFR $\alpha$ , indiquant la variabilité possible des cibles de ce ligand (Gearing *et al*, 1994; Monville *et al*, 2001). En revanche, le CNTF humain ne peut pas activer le récepteur humain du LIF, mais il a été démontré qu'il pouvait utiliser la chaîne  $\alpha$  soluble ou membranaire du récepteur de l'IL-6 comme substitut de sa propre chaîne  $\alpha$  élargissant ainsi son spectre d'action (Schuster *et al*, 2003). Comme pour l'IL-6R $\alpha$ , la forme tronquée soluble de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur agit comme un agoniste. En effet, l'addition de CNTF et de son récepteur soluble (sCNTFR $\alpha$ ) dans le milieu de culture d'une lignée érythroleucémique TF-1, qui n'exprime que les chaînes gp130 et LIFR $\beta$ , induit une réponse biologique (Davis *et al*, 1993a; Gearing *et al*, 1994). Un rôle physiologique a été suggéré pour le sCNTFR $\alpha$ , du fait de sa présence dans le liquide céphalo-rachidien et dans le milieu de culture d'explants musculaires (Davis *et al*, 1993a). Le sCNTFR $\alpha$  pourrait ainsi potentialiser les effets du CNTF sur des neurones ou des fibres musculaires qui répondent déjà à celui-ci, ou sur des cellules qui répondent normalement au LIF et non au CNTF.

Les voies de signalisation utilisées par le CNTF sont identiques à celles observées pour le LIF (Dusanter-Fourt *et al*, 1994; Heinrich *et al*, 1998). Les chaînes  $\beta$  des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque, mais ces chaînes sont phosphorylées après activation par une cytokine. Les JAKs sont activées après dimérisation des récepteurs, et phosphorylent ces derniers en retour. Ces protéines sont préassociées aux sous-unités  $\beta$  (Lutticken *et al*, 1994; Stahl *et al*, 1994). Les JAKs sont relayées par les STATs qui transmettent le signal jusqu'au noyau et

activent la transcription. L'activation d'autres voies, comme celles qui impliquent la PI3-kinase, ou la voie Ras/MAPK, a également été décrite, et il semble que ces différents modes de signalisation interagissent entre eux (Heinrich *et al*, 2003). Cependant, les voies de signalisation décrites en dehors de la voie JAK/STAT interviennent dans la régulation de nombreux autres événements cellulaires et ne sont pas spécifiques du CNTF.

### **C. Axokine® ou CNTF humain recombinant**

Axokine® est une marque déposée par l'entreprise pharmaceutique Regeneron. Cette molécule est un variant du CNTF humain recombinant qui possède trois modifications par rapport à la molécule parente. La glutamine en position 63 est remplacée par une arginine. Cette mutation augmente l'efficacité du CNTF de 4 à 5 fois aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, la cystéine libre en position 17 est remplacée par une alanine résultant en une plus grande stabilité physique et chimique. Enfin, les 15 derniers acides aminés ont été supprimés améliorant ainsi la solubilité de la protéine (Panayotatos *et al*, 1993). Du fait de ses propriétés, cette version du CNTF, Axokine®, est utilisée aussi bien dans les études sur les animaux que dans des essais cliniques.

### **D. Cibles et effets biologiques du CNTF**

Les effets biologiques du CNTF ont été étudiés en parallèle, suivant deux axes très différents : un rôle « différenciateur » sur une cible macrogliale astrocytaire pour l'un, et un rôle « protecteur » sur une cible neuronale pour l'autre. Depuis son identification en 1979 grâce à ses capacités d'augmenter la survie de neurones ciliaires embryonnaires de poulet *in vitro* (Adler *et al*, 1979), de nombreuses études ont été réalisées dans le but d'attribuer un rôle physiologique spécifique à cette cytokine «neurotrophique».

#### **1. Différenciation**

Le CNTF a été initialement identifié pour sa capacité à maintenir la survie de neurones ciliaires de poulet en culture (Adler *et al*, 1979). Son action biologique le rapproche des neurotrophines (Arakawa *et al*, 1990; Ip and Yancopoulos, 1996), bien qu'il ne soit pas homologue à cette famille de protéines.

Dès 1988, l'équipe de Martin Raff a montré que le CNTF provoque la différenciation de cellules gliales progénitrices O-2A (Hughes *et al*, 1988; Lillien *et al*, 1988). En l'absence de facteur exogène, ces cellules se différencient de manière constitutive en oligodendrocytes, mais en présence de CNTF, elles évoluent vers un phénotype d'astrocyte de type II (Hughes *et al*, 1988) caractérisé par la production de la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Il induit donc la différenciation des précurseurs astrocytaires.

De nombreuses hypothèses ont été émises quant à l'existence d'un mécanisme d'action indirect du CNTF (hypothèse renforcée par le fait que les astrocytes ne semblent pas exprimer le CNTFR $\alpha$ ) ou l'intervention de la forme soluble du CNTFR $\alpha$  *in vivo*. Le CNTF peut agir directement sur les astrocytes, y compris en culture, via le récepteur dimérique du LIF, même en l'absence de sa sous-unité spécifique CNTFR $\alpha$  (Monville *et al*, 2001). Cet effet, mis en évidence par une augmentation des taux de la GFAP et du CNTF, nécessite de fortes concentrations du CNTF. *In vivo*, le CNTF pourrait ainsi agir comme molécule de signalisation intergliale, et son action pourrait être potentialisée par les neurones porteurs du CNTFR $\alpha$ .

Le CNTF induit également la différenciation des oligodendrocytes et la formation de myéline (Stankoff *et al*, 2002). Le CNTF permet aussi de maintenir la totipotence de cellules souches embryonnaires (Conover *et al*, 1993) et induit la différenciation des neurones adrénergiques vers la voie cholinergique (Louis *et al*, 1993a).

## **2. Neuroprotection**

Le CNTF permet la survie d'un grand nombre de cellules du système nerveux, et maintient la viabilité des motoneurones *in vitro* (Sendtner *et al*, 1991). Ainsi, chez le poulet, le CNTF est un facteur de survie pour des motoneurones spinaux en culture, isolés à partir d'embryons de six jours, âge auquel débute la mort développementale chez cette espèce (Arakawa *et al*, 1990). Le traitement d'embryons de poulet âgés de 6 à 9 jours par du CNTF réduit de moitié le nombre des motoneurones spinaux lombaires qui dégénèrent (Oppenheim *et al*, 1991). Le CNTF prévient la dégénérescence des motoneurones après axotomie. En effet, alors que l'on n'observe pas de mort motoneuronale rétrograde après axotomie



chez des souris adultes pmn (qui développent une dégénérescence progressive des motoneurones), l'invalidation du gène codant pour le CNTF chez ces mêmes souris pmn provoque une dégénérescence massive des motoneurones, qui peut être bloquée par l'application locale de CNTF (Sendtner *et al*, 1997). Par la suite, d'autres études ont montré que ces effets neuroprotecteurs se retrouvent dans des situations de lésions diverses. Ainsi, chez des rats nouveau-nés, l'application locale de CNTF sur un site d'axotomie empêche la dégénérescence des corps cellulaires des motoneurones (Sendtner *et al*, 1990). Le CNTF atténue aussi les problèmes moteurs des souris ayant des déficiences neuromusculaires (Li *et al*, 1995) et entraîne la survie des neurones dopaminergiques de la substance noire.

Ces études ont clairement montré l'existence d'effets pléiotropes, ne se limitant pas au système nerveux. S'il en ressort que le CNTF est majoritairement un facteur de survie pour de nombreuses populations neuronales dans des conditions pathologiques ou lésionnelles, son rôle physiologique dans le cerveau intact reste encore à démontrer.

### **3. CNTF et muscle squelettique**

En dehors du système nerveux, mais fortement lié à celui-ci, le muscle squelettique semble être une autre cible potentielle de l'effet protecteur du CNTF. Le CNTF possède des effets protecteurs sur l'axe neuro-musculaire, puisque son administration permet de maintenir la polyinnervation des muscles squelettiques, phénomène normalement observé de façon transitoire pendant le développement embryonnaire et les premières semaines post-natales (Ulenkate *et al*, 1994). Il permet aussi une réinnervation plus importante des muscles après écrasement du nerf facial (Forger *et al*, 1993). Cependant, son action ne s'exerce pas uniquement du côté neuronal. Ainsi, comme pour les motoneurones, le CNTF préserve les muscles contre l'effet d'une axotomie à la naissance (Forger *et al*, 1993; Guillet *et al*, 1999) et chez l'adulte, puisque l'atrophie musculaire provoquée par la dénervation peut être réduite par l'ajout de CNTF exogène (Helgren *et al*, 1994). Le CNTF semble agir directement sur les fibres musculaires, entraînant la phosphorylation de son récepteur et l'induction de gènes précoces. Enfin, le CNTF joue un rôle de maintien de la tonicité musculaire au cours du vieillissement (Guillet *et al*, 1999).

#### **4. Autres cibles du CNTF**

Chez les rongeurs, le CNTF agit également sur la maturation des oligodendrocytes (Barres *et al*, 1993; Louis *et al*, 1993b; D'Souza *et al*, 1996; Stankoff *et al*, 2002), les astrocytes (Levison *et al*, 1996; Dallner *et al*, 2002) et les adipocytes (Ott *et al*, 2002; Zvonic *et al*, 2003). Cette cytokine possède des actions redondantes avec l'IL-6 sur les cellules hépatiques (Wang and Fuller, 1995) ou au cours de l'hématopoïèse (Hawley, 1994). Une activité spécifique du CNTF est sa capacité à maintenir sous une forme indifférenciée les cellules souches embryonnaires. En effet, les cellules ES expriment les trois sous-unités du CNTFR (Conover *et al*, 1993; Sleeman *et al*, 2000).

#### **E. CNTF et maladies neurodégénératives**

Toutes ces observations ont suscité de nombreux espoirs quant à l'utilisation du CNTF comme agent thérapeutique dans les maladies neurodégénératives. Parmi les très nombreuses populations neuronales sur lesquelles le CNTF possède un effet protecteur, c'est essentiellement autour des motoneurones que se sont concentrées les études au début des années 1990. Des essais cliniques utilisant le CNTF ont été menés, en particulier dans la thérapie contre la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie de Huntington. Il a également été suggéré que le CNTF ait un rôle neuroprotecteur dans la sclérose en plaques. Le CNTF est également testé dans le traitement de l'obésité, après l'observation d'une perte de poids chez les souris et les patients traités par cette cytokine.

##### **1. Sclérose latérale amyotrophique (SLA)**

Le CNTF pourrait être utilisé comme un « facteur de secours » *in vivo* pour le système neuromoteur. En particulier, le CNTF a été pressenti pour s'opposer à la dégénérescence motoneuronale fatale subie par les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique.

### ***a. Caractéristiques de la maladie***

La sclérose latérale amyotrophique ou maladie de Charcot-Marie-Tooth est une maladie neurodégénérative liée à l'altération progressive des neurones moteurs (Pradat and Bruneteau, 2006b; a). Elle associe un syndrome pyramidal aux signes d'atteinte neurologique périphérique et une atteinte du bulbe rachidien qui fait la gravité de la maladie et reflète la diffusion de processus pathologique. Les fonctions supérieures restent intactes : le malade garde tout au long de l'évolution une lucidité et une conscience indemnes. La maladie est généralement sporadique, mais il existe aussi des formes familiales chez environ 5% des patients. La durée moyenne de survie à partir des premiers symptômes est de 3 ans. La mort est liée à la paralysie des muscles respiratoires qu'aggravent le défaut de toux et des troubles de déglutition liés au syndrome bulbaire. La cause exacte de cette maladie reste inconnue. Les hypothèses émises sur les mécanismes physiopathologiques de la SLA sont un stress oxydatif, une dérégulation de l'expression du VEGF, l'excito-toxicité où un niveau trop élevé de glutamate dans la fente synaptique serait la cause d'un épuisement cellulaire suite à une hyperactivité du système excitateur (Borasio and Miller, 2001; Strong *et al*, 2005).

### ***b. Essais cliniques***

Depuis 1992, trois essais cliniques, fondés sur l'administration de CNTF au niveau du système nerveux central, ont été menés afin d'établir les conditions d'un traitement permettant le blocage des phénomènes de dégénérescence neuronale dans la sclérose latérale amyotrophique (Aebischer *et al*, 1996; 1996; Penn *et al*, 1997).

Le premier, lancé par l'équipe de la société de biotechnologie Regeneron, était fondé sur l'injection systémique quotidienne de différentes doses de CNTF humain purifié. Cet essai a été interrompu, en raison d'effets secondaires trop importants. Dans de nombreux cas, les malades ont en effet présenté une fièvre importante, liée à l'activation des gènes de la réponse inflammatoire aiguë au niveau hépatique, un amaigrissement induit notamment par une fonte musculaire, et divers autres troubles parmi lesquels une toux chronique (1996). Ces résultats, accompagnés de l'apparition d'anticorps anti-CNTF dans le

plasma, et de l'absence de la protéine dans le liquide céphalo-rachidien – indiquant un passage très faible dans le système nerveux central – suggéraient fortement que la voie d'apport systémique n'était pas appropriée.

Un second essai, qui n'a concerné que quelques patients, a tenté de contourner cette difficulté en administrant la protéine recombinante directement dans l'espace intrathécal, à l'aide d'une mini-pompe (Penn *et al*, 1997). La faisabilité de cette approche s'est révélée discutable, en raison de l'instabilité de la protéine maintenue à température ambiante dans le réservoir relié à la pompe, et de sa tendance à former des agrégats dans le milieu comme le long des parois du cathéter.

Enfin, un troisième essai, chez 17 patients, a été réalisé grâce à une approche de thérapie génique originale fondée sur l'implantation intrathécale de cellules génétiquement modifiées pour synthétiser une forme de CNTF capable d'être sécrété. Ces cellules sont encapsulées dans une membrane semi-perméable ne permettant le passage qu'à des molécules de petite taille (Aebischer *et al*, 1996). Malgré une augmentation importante de la concentration du CNTF dans le liquide céphalo-rachidien, cette administration n'a pas eu d'effet thérapeutique significatif. Les raisons de cet échec résident peut-être dans le fait que le CNTF n'a pas pu traverser le tissu nerveux spinal pour atteindre les cibles motoneuronales. La sécurité d'une telle administration intrathécale de CNTF a toutefois été ainsi démontrée, car aucune des complications induites par l'administration systémique n'a été observée (Aebischer *et al*, 1996; Zurn *et al*, 2000).

## **2. Dégénérescence striatale et chorée de Huntington**

Au cours de ces dernières années, l'intérêt thérapeutique potentiel du CNTF s'est brusquement réorienté vers une autre maladie neurodégénérative, la chorée de Huntington.

### ***a. Caractéristiques de la maladie***

La chorée de Huntington est une maladie neurodégénérative. Elle se caractérise par une dégénérescence des neurones GABAergiques du striatum qui subit une atrophie sévère, et dont la disparition entraîne des troubles très divers

(Brouillet *et al*, 2000). Elle provoque à partir du déclenchement des signes cliniques, une détérioration intellectuelle, des désordres moteurs (mouvements choréiques, bradykinésie) et des troubles psychiatriques sévères. L'issue de la maladie est fatale en 10 à 20 ans, le malade s'éteignant – souvent par cachexie – dans un tableau de rigidité posturale et de démence totale. De plus, c'est une maladie génétique autosomale dominante à pénétrance complète, donc tout porteur d'un allèle muté développera la maladie (Conneally, 1984).

### ***b. Modèles animaux de la chorée de Huntington***

Cette pathologie peut être reproduite chez l'animal par injection d'acide quinolinique (analogue du glutamate) dans le striatum ou d'acide 3-nitropropionique (inhibiteur non compétitif de la succinate déshydrogénase) par voie systémique (Beal *et al*, 1991; Beal *et al*, 1993; Brouillet *et al*, 1995; Nicholson *et al*, 1995). Dans les deux modèles, chez le rat comme chez le primate non-humain, l'apport de CNTF dans le striatum s'est révélé extrêmement efficace pour bloquer la dégénérescence. Ainsi, la libération intra-striatale d'un analogue du CNTF par mini-pompe a réduit très significativement le volume de la zone de lésion chez le rat (Anderson *et al*, 1996). L'implantation intra-striatale des cellules encapsulées productrices de CNTF a eu un effet comparable chez le rat (Emerich *et al*, 1996) et chez le primate (Emerich *et al*, 1997; Mittoux *et al*, 2000). Dans une étude récente, utilisant le modèle de lésion chronique induit par injections systémiques répétées d'acide 3-nitropropionique, le CNTF a eu une action protectrice, mais également un effet fonctionnel stimulateur. L'apport de CNTF permet en effet de rétablir des fonctions neuronales perdues du fait du dysfonctionnement – qui précède la dégénérescence – des neurones striataux (Mittoux *et al*, 2000).

### ***c. Essais thérapeutiques***

Sur la base de ces travaux, et à la suite des essais cliniques réalisés chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique, un premier essai clinique (de phase I) a été lancé visant à confirmer l'innocuité d'une implantation intracérébrale de capsules contenant des cellules génétiquement modifiées pour produire et libérer du CNTF (English and Schwartz, 1995). Des essais cliniques

ont été menés, fondés sur l'administration continue de CNTF dans le système nerveux central, afin d'établir les conditions d'un traitement permettant le blocage des phénomènes de dégénérescence neuronale dans la maladie de Huntington (Bachoud-Levi *et al*, 2000). Cet essai sur 6 patients s'est fait avec une approche de thérapie génique *ex vivo* basée sur des cellules BHK génétiquement modifiées et encapsulées qui délivrent du CNTF implantées dans le ventricule latérale droit. Dans cet essai de phase I, le but principal a été d'évaluer la sécurité et la tolérance de cette procédure.

### **3. Sclérose en plaques**

Une mutation inactivant le gène du CNTF est retrouvée sous forme homozygote dans 2,3% de la population japonaise (Takahashi *et al*, 1994) (Giess *et al*, 1998) et serait associée avec un développement plus précoce de la sclérose en plaques (Giess *et al*, 2002). Cette mutation n'entraîne pas d'anomalies neurologiques. Mais ce résultat reste controversé (Hoffmann *et al*, 2002).

#### ***a. Caractéristiques de la maladie***

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire du système nerveux central. C'est la première cause d'invalidité chez l'adulte. Les caractéristiques pathologiques de la sclérose en plaques sont une démyélinisation, une inflammation, une gliose et des dommages axonaux. Encore aujourd'hui, l'étiologie de la maladie nous échappe. Cependant, une réponse immune aberrante, relayée par les lymphocytes T et apparemment restreinte au système nerveux central, pourrait provoquer la démyélinisation et les lésions axonales. Aucun antigène responsable de la maladie n'a été identifié. La théorie actuelle invoque un processus d'auto-immunité où des lymphocytes T activés pourraient reconnaître des antigènes de la myéline ou des oligodendrocytes. Le TNF- $\alpha$  est l'une des cytokines impliquées de façon prédominante dans le processus de démyélinisation inflammatoire et il exerce une action cytotoxique pour les oligodendrocytes qui produisent la myéline centrale (Selmaj and Raine, 1988). Des traitements immunomodulateurs tels que l'interféron  $\beta$  ou le glatiramer acétate ont eu seulement des effets limités sur la progression de la maladie

(Arnason, 1999; Arnon and Aharoni, 2004). Des approches neuroprotectives complémentaires pourraient alors être bénéfiques.

***b. L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle animal de la sclérose en plaques***

Dans ce modèle, des lésions inflammatoires démyélinisantes sont induites chez l'animal (rat, souris, singe) par injection systémique de différents constituants peptidiques de la myéline comme la protéine basique de la myéline (MBP), la « myelin oligodendrocytes glycoprotein » (MOG) et la protéine protéolipidique (PLP) (Pettinelli and McFarlin, 1981; Yamamura *et al*, 1986; Genain *et al*, 1996). L'EAE peut également être induite par le transfert passif de lymphocytes T activés par ces mêmes antigènes chez un autre animal ou *in vitro* (Pettinelli and McFarlin, 1981).

Le rôle protecteur de CNTF dans le modèle murin de sclérose en plaques (EAE), a été déduit des observations faites sur les souris CNTF<sup>-/-</sup> (Linker *et al*, 2002). Une administration journalière de CNTF murin améliore les signes cliniques dans ce modèle murin. Ce traitement ne change pas la réponse immunitaire périphérique mais réduit le nombre d'infiltrats périvasculaires, le nombre de cellules T et le taux d'activation de la microglie dans la moelle épinière. La perméabilité de la barrière hématoencéphalique est réduite de façon significative chez les animaux traités au CNTF. Après l'arrêt du traitement, l'inflammation et les symptômes reviennent à leur niveau de départ. Le CNTF inhibe l'inflammation dans la moelle épinière, entraînant une amélioration des symptômes de l'EAE pendant toute la durée du traitement. Nous avons montré une réduction marquée des symptômes de l'EAE avec un nombre réduit d'infiltrats inflammatoires dans la phase aiguë de la maladie et une augmentation du nombre d'oligodendrocytes, de neurones et d'axones dans les souris traitées avec une forte dose de CNTF dans la phase chronique de la maladie (Kuhlmann *et al*, 2006).

#### **4. Effets secondaires du CNTF**

Les applications cliniques du CNTF humain restent limitées par sa toxicité à haute dose. Dans un essai clinique avec des patients atteints de SLA contrôlé

avec un placebo, la dose a été limitée à 5 µg/kg/jour où cependant aucun effet bénéfique n'a été observé comparé au contrôle (1996). A des concentrations suffisantes pour entraîner une perte de poids, le CNTF n'a aucun effet secondaire intolérable. A forte concentration, le CNTF de rat induit un hétérodimère formé des chaînes humaines gp130 et LIFR même en l'absence de CNTFR $\alpha$  (Gearing *et al*, 1994). Il a été observé une activité du CNTF humain recombinant à forte dose sur les cellules HepG2 qui n'expriment pas le CNTFR, mais cette observation n'a pas été retrouvée sur les cellules murines BaF/3 transfectées de façon stable avec les chaînes humaines gp130 et LIFR. Le CNTF humain est incapable d'activer un hétérodimère constitué de gp130 et LIFR humains en l'absence d'un récepteur  $\alpha$ . Cependant l'IL-6R humain peut servir de substitut au CNTFR $\alpha$  humain dans l'assemblage d'un récepteur fonctionnel (Kallen *et al*, 1999). La toxicité intolérable du CNTF humain a été observée à des doses supérieures à 5 µg/kg dans un essai de toxicité, et les effets les plus dangereux apparaissent à des doses variant de 20 à 100 µg/kg. Les effets secondaires pourraient non seulement être dus à l'interaction du CNTF avec son propre récepteur  $\alpha$  lié à la membrane mais probablement dû à l'activation de cellules cibles considérées jusqu'à présent comme ne réagissant pas au CNTF via l'IL-6R sous forme de récepteur lié à la membrane ou sous forme de récepteur soluble (Schuster *et al*, 2003). Ainsi, le CNTF pourrait élargir ses cibles d'action.

Contrairement au CNTF, les souris déficientes pour l'IL-6 sont résistantes à l'EAE. Cette différence d'effets *in vivo* pourrait refléter une différence de cellules cibles activées par ces cytokines. Dans l'analogue du CNTF, Axokine, la glutamine 63 du CNTF humain a été substituée par l'arginine 63 du CNTF de rat qui est connu pour augmenter l'activité spécifique du CNTF humain. Le CNTF de rat ne liant pas l'IL-6R, il est probable que l'Axokine ne lie pas l'IL-6R. Un modèle moléculaire démontre que l'Arg-63 ne peut pas se loger dans l'aire d'interaction entre le CNTF et l'IL-6R humain. Axokine pourrait alors être plus active et plus spécifique que le CNTF naturel humain et pourrait même permettre une réinvestigation des effets cliniques dans la SLA avec de fortes doses de CNTF (Schuster *et al*, 2003).



## **F. Le CNTF dans le traitement de l'obésité et du diabète**

Le CNTF contribue à la régulation du poids dans des modèles murins d'obésité (Gloaguen *et al*, 1997; Lambert *et al*, 2001). Le CNTF a été montré comme induisant une sévère anorexie et une perte de poids pendant les essais cliniques pour le traitement de la SLA. La sécurité et l'efficacité de l'Axokine comme agent de perte de poids a été confirmé dans un récent essai clinique bien que le développement d'anticorps neutralisants puisse restreindre son application générale (Ettinger *et al*, 2003).

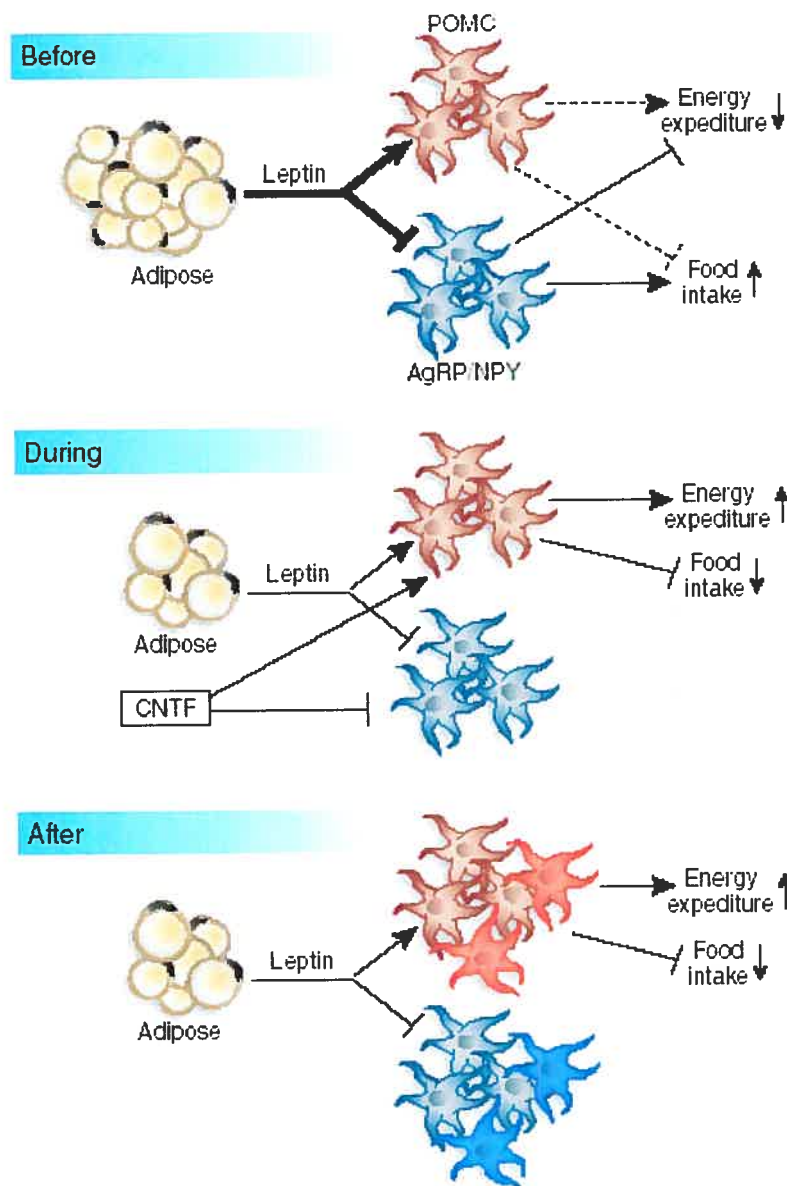
### **1. Régulation du poids et obésité**

Le poids corporel est régulé par un système neuro endocrinien complexe dans lequel le tissu adipeux produit des hormones telles que la leptine qui informe le cerveau de l'état des stocks énergétiques périphériques. Dans l'hypothalamus, il existe deux types de neurones qui sont les cibles de la leptine : elle active les neurones POMC (pro-opiomelancortin) et inhibe les neurones AgRP/NPY (agouti-related protein/neuropeptide Y). Ces neurones fournissent respectivement les agonistes ou antagonistes des récepteurs à la mélanocortine qui inhibe la prise alimentaire et les dépenses énergétiques (Seeley *et al*, 2004). Dans l'obésité, la difficulté du traitement est la rechute après l'arrêt du traitement. En effet, quand les individus perdent du poids, le taux de leptine chute et cause un nombre de changements neurochimiques dans l'hypothalamus qui augmentent la faim et réduisent les dépenses énergétiques, prédisposant les individus à retourner à leur poids initial. De plus, dans l'obésité, le métabolisme des acides gras dans les muscles squelettiques est compromis, aboutissant à l'accumulation de lipides intramyocellulaires qui est associée avec la résistance à l'insuline et est un marqueur pour le développement des diabètes de type II (Shulman, 2000).

### **2. Rôle du CNTF dans le traitement de l'obésité**

Le CNTF produit un nombre de réponses similaires à celle de la leptine avec deux différences importantes. Premièrement, les rongeurs obèses perdent du poids avec un traitement au CNTF mais sont résistants à la perte de poids induit

par la leptine (Lambert *et al*, 2001; Bluher *et al*, 2004). Deuxièmement, la perte de poids induite par le CNTF semble se maintenir après le traitement (Lambert *et al*, 2001; Ettinger *et al*, 2003). Le traitement au CNTF provoque une neurogénèse dans la région de l'hypothalamus qui contrôle la prise de nourriture et le poids corporel. Les nombreux neurones produits expriment les neuropeptides POMC et AgRP/NPY (Kokoeva *et al*, 2005). Ainsi, le maintien de la perte de poids résulte de la croissance de nouveaux neurones sensibles à la leptine dans l'hypothalamus ce qui améliore la réponse à la leptine endogène (Figure 8). Cette neurogénèse fait partie de la plasticité hypothalamique. Ainsi, le traitement avec le CNTF produit une réduction du poids corporel qui se maintient non pas par neurotoxicité mais avec une croissance de nouveaux neurones qui influencent la balance énergétique (Seeley, 2005).



**Figure 8 : Le CNTF mène à une perte de poids et à une neurogénèse.** La leptine fournit un signal clé de rétrocontrôle des tissus adipeux périphériques vers deux types de neurones dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Les neurones POMC (en marron) sont activés par la leptine, inhibent la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique, alors que les neurones AgRP/NPY (en bleu) ont une réponse à la leptine opposée et donc des effets opposés sur la balance énergétique. Pendant le traitement au CNTF, le poids corporel diminue en raison de l'action du CNTF qui mime les effets de la leptine dans l'hypothalamus. Ce traitement stimule la formation de nouveaux neurones (en orange) impliqués dans la régulation du poids (Seeley, 2005).

La leptine et le CNTF réduisent l'activité AMPK (AMP-activated protein kinase) et la phosphorylation de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC) dans le noyau arqué (groupe de cellules de l'hypothalamus) et dans le noyau paraventriculaire. Axokine dévie la résistance à la leptine induite par la diète en réduisant l'activité AMPK hypothalamique. AMPK est une sérine thréonine kinase exprimée de façon ubiquitaire qui est activée en réponse à une augmentation du taux AMP/ATP cellulaire (Kemp *et al*, 2003; Kahn *et al*, 2005). Une fois activée, AMPK déclenche les voies générant de l'ATP telle que l'oxydation des acides gras à travers l'inhibition ou l'activation de l'ACC. L'expression du CNTFR est localisée dans les neurones hypothalamiques du noyau arqué, une aire qui recouvre les neurones activés par la leptine. Les effets de la leptine et de CNTF sont attribués au profil d'expression et à l'homologie de signalisation de leurs deux récepteurs à l'intérieur de cette région hypothalamique. Le CNTF réduit fortement la signalisation hypothalamique de l'AMPK et la prise alimentaire (Steinberg *et al*, 2006), alors qu'il stimule la signalisation de l'AMPK et l'oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques. Un médiateur potentiel de la résistance à la leptine est SOCS-3 qui inhibe STAT3. CNTF augmente la phosphorylation de STAT3 dans les neurones hypothalamiques (Lambert *et al*, 2001; Kokoeva *et al*, 2005). La réduction importante de la signalisation hypothalamique de l'AMPK par le CNTF représente un mécanisme potentiellement important sur la prise alimentaire (Steinberg *et al*, 2006).

Le CNTF améliore la tolérance au glucose chez les rongeurs comme chez l'homme. Il agit au niveau du système nerveux périphérique en altérant l'expression des gènes hépatiques de la même façon que la leptine (Cohen *et al*, 2002; Sleeman *et al*, 2003). Mais les effets du CNTF sur les muscles squelettiques semblent indépendants du système nerveux central (Watt *et al*, 2006). CNTF active une signalisation via le complexe récepteur CNTFR $\alpha$ -IL-6R-gp130 qui permet d'augmenter l'oxydation des acides gras et de réduire la résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques en activant la voie AMPK (Watt *et al*, 2006). Le CNTF améliore la sensibilité à l'insuline périphérique en évitant l'induction de SOCS-3 par la diète en acides gras. La leptine comme le CNTF réduisent l'expression hépatique de l'enzyme stearoyl-CoA desaturase 1, qui est une enzyme limitante dans la synthèse des lipides complexes. Le CNTF via l'activation de

l'AMPK, augmente l'expression des gènes *in vivo*, en induisant l'expression de gènes codants pour des protéines mitochondriales qui améliorent l'oxydation des acides gras dans les fibres oxydatives (Watt *et al*, 2006). CNTF pourrait exercer quelques uns de ses effets métaboliques en augmentant la production de l'IL-6 et ainsi ces deux cytokines pourraient agir en concert (Watt *et al*, 2006). L'activation de l'AMPK dans les muscles squelettiques par le CNTF fournit une nouvelle dimension pour contrôler le métabolisme dans les maladies liées à l'obésité. En effet, la capacité de CNTF à activer l'AMPK des muscles squelettiques de façon indépendante du système nerveux central, augmente la possibilité de développer des médicaments qui ciblent les muscles squelettiques sans avoir besoin de franchir la barrière hématoencéphalique.

### **G. CNTF et maladies cardiovasculaires**

L'obésité est un facteur important dans le développement de maladies cardiovasculaires. Le CNTF qui a une action parallèle à celle de la leptine dans l'hypothalamus, n'était pas connu pour avoir une activité cardiaque. La voie de signalisation de CNTF connue pour activer une voie de signalisation parallèle à celle de la leptine dans l'hypothalamus démontre un rôle important dans la bioactivité cardiaque. Le récepteur au CNTF est présent dans le sarcolemme cardiaque et son activation comme la leptine conduit à la régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche dans les souris déficientes pour la leptine (Raju *et al*, 2006). L'Axokine influence la transduction du signal dans des myocytes cardiaques isolés supportant un rôle pour les effets directs sur le cœur en activant la phosphorylation de STAT3 et de ERK1/2 (Raju *et al*, 2006). La leptine a un effet antihypertrophique en présence d'une voie de signalisation intacte. Les voies de signalisation induites par CNTF permettent la régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche probablement en restaurant les voies de signalisation en aval (Raju *et al*, 2006). Il est possible que les récepteurs au CNTF ne soient pas seulement présents sur les myocytes cardiaques mais également sur les autres tissus comme les ganglions cardiaques impliquant la possibilité d'effets paracrines à l'intérieur du cœur (Raju *et al*, 2006). Le CNTF représente une ouverture sur les implications thérapeutiques pour les patients ayant une

maladie cardiovasculaire liée à l'obésité et pour les autres causes de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Raju *et al*, 2006).

## **H. Dégénérescence rétinienne**

La rétinite pigmentaire est l'une des premières causes de cécité chez les jeunes adultes, affectant environ un million de patients à travers le monde. C'est une dystrophie héréditaire de la rétine due à une perte des photorécepteurs (Kalloniatis and Fletcher, 2004). Les patients subissent une perte lente et irréversible de la vision périphérique. A l'origine, de nombreuses mutations peuvent engendrer la maladie. 131 gènes responsables de dégénérescences rétinienne sont actuellement connus (Kalloniatis and Fletcher, 2004).

Le CNTF est connu pour ses effets protecteurs sur des modèles animaux de rétinite pigmentaire (Sieving *et al*, 2006). L'encapsulation du CNTF permet la délivrance locale, effective et persistante dans la chambre postérieure de l'œil en s'affranchissant de la barrière hémato-rétinienne (Tao *et al*, 2002). Sur des modèles animaux, cette encapsulation de CNTF permet de protéger de manière efficace la rétine contre la dégénérescence. L'effet neuroprotecteur du CNTF est dose dépendant. De plus, les capsules implantées sont bien tolérées et ont gardé leurs fonctionnalités pendant la période d'implantation (Tao *et al*, 2002). L'injection de CNTF ne corrige pas l'anomalie génétique responsable de la maladie mais permet de corriger les effets délétères qu'elle occasionne. En 2002, l'entreprise Neurotech, après avoir démontré l'efficacité de ce procédé chez l'animal, a lancé un essai clinique de phase I chez l'homme. Des résultats d'essais précliniques ont montré, sur une cohorte de dix patients, une réduction de la dégénérescence rétinienne par l'administration de CNTF dans des systèmes encapsulés (Mohand-Said *et al*, 2000; Mohand-Said *et al*, 2001; Tao *et al*, 2002; Sieving *et al*, 2006).

Cet essai clinique démontre une validité intéressante dans l'utilisation de CNTF dans des maladies dégénératives et représente un réel succès clinique dans ce domaine.

## **I. Conclusions**

La description des effets biologiques du CNTF donne un aperçu de l'étendue des activités potentielles de cette molécule. Le nombre très important d'études en cours sur le sujet témoigne paradoxalement de l'échec à définir sa fonction dans des conditions physiologiques normales. Néanmoins, les résultats issus de ces différents travaux indiquent que le CNTF exerce surtout ses activités au niveau du système nerveux et du muscle, et que s'il est capable de modifier le développement embryonnaire des organismes *in vitro* ou *in vivo* par un apport exogène, il n'est pas intrinsèquement essentiel à ce développement. Enfin, la fonction la mieux démontrée du CNTF semble finalement résider dans le rôle de facteur de secours de diverses populations neuronales après un traumatisme ou une lésion. C'est dans ce contexte que des essais de traitement de maladies neurodégénératives ont été réalisés. Leurs résultats sont encore modestes aujourd'hui, mais les difficultés rencontrées pour introduire cette molécule de façon continue dans le système nerveux central des patients – moelle épinière ou striatum – représentent vraisemblablement un premier obstacle à surmonter pour que l'effet thérapeutique du CNTF puisse être étudié de façon valable.

## **II. Le second ligand du CNTFR : le complexe CLC/CLF**

La grande différence entre le phénotype silencieux des souris CNTF<sup>-/-</sup> et la gravité de celui des souris CNTFR<sup>-/-</sup> a suggéré l'existence d'un second ligand du récepteur au CNTF (DeChiara *et al*, 1995). Ce second ligand a été mis en évidence en 2000 par les équipes des Dr Gauchat et Dr Gascan qui ont démontré l'existence des complexes CLC/CLF ou CLC/sCNTFR comme seconds ligands du CNTFR.

### **A. Clonage et profil d'expression de CLF**

Les récepteurs aux cytokines de type I sont caractérisés par la présence d'une région extracellulaire conservée d'environ 200 acides aminés contenant deux modules fibronectine de type III. Cette région, connue comme le domaine de liaison aux cytokines, joue un rôle essentiel dans la fonction récepteur en terme de liaison du ligand et de la formation du complexe récepteur. Elle est caractérisée par quatre résidus cystéines conservés dans le premier module et par le motif WSXWS dans le second. Les récepteurs pour les cytokines de type IL-6 sont typiques de cette famille, formant des complexes de liaison multimériques et partageant les sous-unités transductrices du signal. A partir de ces données, en 1998, l'équipe de Elson *et al*. a identifié et cloné à partir d'une banque d'EST, le Cytokine-Like Factor 1 (CLF-1) (Elson *et al*, 1998). Les CLF humain et murin partagent 96 % d'homologie dans la séquence en acides aminés, et présentent une homologie significative avec les récepteurs aux cytokines de type I.

Le gène humain de CLF est constitué de 9 exons, et code pour une protéine de 422 acides aminés avec un peptide signal de 37 résidus. Le premier exon code pour le peptide signal, le second code pour le domaine « Immunoglobulin-like », les codons 3 et 4 codent pour le domaine N-terminal ressemblant au récepteur aux cytokines alors que les exons 5 et 6 codent pour celui en C-terminal. Les exons 7 et 8 ne montrent aucune homologie avec d'autres membres de la famille des récepteurs gp130, alors que l'exon 9 possède le codon stop dans sa partie 5' et le signal de polyadénylation en 3'. Aucun domaine transmembranaire putatif n'a été identifié.



Le profil d'expression de CLF démontre qu'il est fortement exprimé dans les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus, le placenta, l'estomac, la moelle osseuse et les poumons fœtaux (Elson *et al*, 1998). CLF est une protéine sécrétée, suggérant ainsi qu'il soit une sous-unité soluble d'un complexe récepteur à cytokine, comme la forme soluble de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-6R, ou une sous-unité d'une cytokine multimérique comme la sous-unité p40 de l'IL-12. CLF correspond au récepteur soluble du complexe cytokinique CLC/CLF (Elson *et al*, 2000).

L'inactivation du gène de CLF chez la souris conduit à la mort périnatale des animaux qui ne réussissent pas à s'alimenter (Alexander *et al*, 1999a). Une analyse phénotypique détaillée de ces souris révèle également une perte en neurones moteurs. L'inactivation du gène codant pour CLF chez la souris conduit à un phénotype voisin de celui observé chez les animaux CNTFR<sup>-/-</sup> avec mort périnatale des animaux, ce qui renforce encore l'analogie fonctionnelle entre CLC/CLF et le deuxième ligand pour le récepteur au CNTF.

## **B. Clonage et profil d'expression de CLC**

En 1999, Senaldi *et al* ont identifié un nouveau membre de la famille des cytokines gp130 en utilisant une librairie d'ADNc construite à partir de cellules Jurkat, lymphome de cellules T humaines. Dû à ces effets neurotrophiques et stimulateurs des cellules B, il a été nommé « novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) (Senaldi *et al*, 1999). Indépendamment, Shi *et al* ont caractérisé la même protéine en utilisant un algorithme de type réseau neural appliqué à une large banque de données d'EST (Shi *et al*, 1999). Par son homologie avec la cardiotrophin-1 (CT-1), ce groupe l'a appelée Cardiotrophin-Like Cytokine (CLC) (Shi *et al*, 1999). Dans tout ce document, nous utiliserons le terme de Cardiotrophin-Like Cytokine ou CLC.

CLC est une protéine de 225 acides aminés. Sa structure primaire contient un peptide signal putatif conventionnel couvrant les acides aminés 1 à 27 de façon similaire à l'IL-6, l'IL-11, le LIF et l'OSM. Quatre résidus cystéines sont présents, deux d'entre eux sont localisés dans le peptide signal. CLC contient un site potentiel de N-glycosylation sur l'acide aminé 29. La taille prédite de CLC correspond à un peptide de 198 acides aminés de 22 kDa. La séquence en acides

aminés de CLC humain a 27% d'homologie avec la cardiotrophin-1, 24% avec l'IL-11, 23% avec le CNTF, 21% avec le LIF et 19% avec l'IL-6 et l'OSM. Comme CLF, CLC murine partage 96% d'homologie avec CLC humaine au niveau de la séquence en acides aminés. C'est également une protéine de 225 acides aminés avec un peptide signal de 27 résidus et un site potentiel de N-glycosylation (acide aminé 29) indiquant une forte conservation lors de l'évolution. Chez l'Homme, le gène de CLC se situe sur le chromosome 11q13. Il est constitué de trois exons et deux introns. Les gènes CLC et CNTF sont localisés à proximité puisque que le CNTF est localisé sur le chromosome 11q12. En revanche, chez la souris, le gène de CLC se situe sur le chromosome 19.

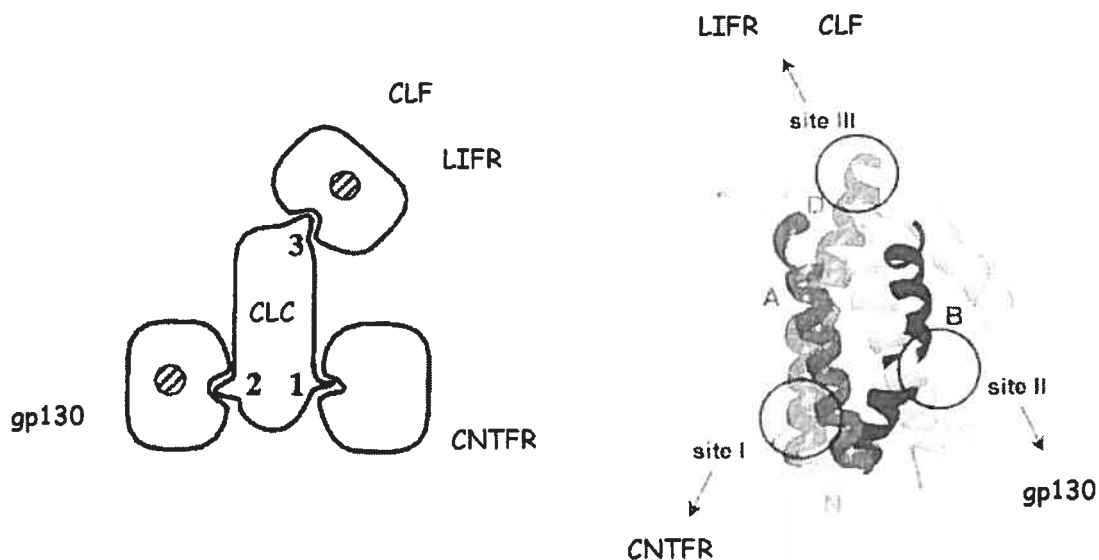
On retrouve des transcrits de cette cytokine dans un grand nombre de tissus comme le cœur, le foie, le rein, le colon, le poumon, la moelle osseuse et le muscle squelettique. Des transcrits de cette protéine ont aussi été détectés chez la souris durant le développement embryonnaire. Par hybridation *in situ*, l'ARNm de CLC est détecté dans les fibres musculaires squelettiques des embryons de souris (de Bovis *et al*, 2005). Cet ARN est co-exprimé avec CLF ou CNTFR. Ainsi, l'ARNm de CLC est exprimé dans une grande variété de tissus suggérant un rôle biologique important dans de nombreuses fonctions cellulaires.

### **C. La sécrétion de CLC**

Bien que CLC contienne un peptide signal putatif pouvant la faire entrer dans la voie classique de sécrétion, CLC est retenue à l'intérieur de la cellule par un mécanisme encore inconnu. La sécrétion cellulaire de CLC nécessite la formation d'un complexe hétéromérique avec d'autres facteurs. A l'heure actuelle, deux partenaires susceptibles d'entraîner la sécrétion cellulaire de CLC ont été identifiés. Sur le modèle de l'IL-12, cette cytokine doit être associée à des récepteurs solubles, le Cytokine Like Factor-1 (CLF) (Elson *et al*, 2000) ou le CNTFR $\alpha$  soluble (Plun-Favreau *et al*, 2001) pour être libérée dans le milieu extracellulaire. La co-expression de CLC avec CLF conduit à la formation d'un hétérodimère non-covalent qui est sécrété à l'extérieur de la cellule. Cependant, en fonction du récepteur soluble associé à CLC, la cytokine composite formée n'aura pas exactement les mêmes activités. En effet, la cytokine composite CLC/CLF va recruter le même complexe récepteur que le CNTF et ainsi agir sur

des neuroblastomes ou permettre la survie de motoneurones embryonnaires *in vitro* (Elson *et al*, 2000; Lelievre *et al*, 2001). CLC/CLF n'est actif que sur des tissus exprimant à leur surface la forme membranaire du CNTF. Contrairement à ce qui est observé pour le CNTF, le CNTFR soluble ne potentialise pas la réponse CLC/CLF. Cependant, la cytokine composite CLC/CNTFR $\alpha$  soluble va recruter le même complexe récepteur que le LIF avec des effets similaires sur les cellules cibles (Plun-Favreau *et al*, 2001).

On observe la présence sur CLC d'un « site I » et d'un « site III » qui définissent respectivement les zones de contact avec les sous-unités CNTFR et LIFR (Figure 9) (Bravo and Heath, 2000). La zone d'interaction avec gp130 ou « site II » est, comme pour les cytokines voisines, définies par des points de contact multiples dispersés sur une large portion de la cytokine. Ses récepteurs solubles ne s'associent pas par le même site au niveau de CLC ; CLF se lie à CLC par le site III de cette protéine, alors que le CNTFR $\alpha$  se fixe par le site I (Perret *et al*, 2004). CLF va régler la sécrétion de la partie cytokinique et CNTFR va conditionner la réponse biologique de la cytokine. D'une façon similaire à celle du CNTF, la fixation membranaire de CLC/CLF va induire la dimérisation et le recrutement des sous-unités de transduction gp130 et LIFR puis activer en aval les cascades de transduction du signal.



**Figure 9 : Les sites d'interaction de CLC avec les chaînes réceptrices** (Bravo and Heath, 2000; Perret *et al*, 2004)

## **D. Rôles physiologiques de CLC**

### **1. Fonction neurotrophique**

CLC supporte la survie des neurones moteurs et sympathiques embryonnaires (Senaldi *et al*, 1999; Elson *et al*, 2000; Plun-Favreau *et al*, 2001). CLC et CNTF agissent aussi efficacement comme facteur de survie pour les motoneurones embryonnaires mais les effets de ces deux cytokines ne sont pas additifs (Forger *et al*, 2003). D'une façon intéressante, l'application *in vivo* de CLC montre un effet spécifique local, augmentant le nombre de motoneurones lombaires de la moelle épinière mais pas le nombre de motoneurones branchiaux ou thoraciques (Forger *et al*, 2003). CLC pourrait induire la différenciation astrocytaire des cellules foetales neuroépithéliales (Uemura *et al*, 2002).

La mort neuronale prématurée est une des caractéristiques des maladies du système nerveux central et des yeux, incluant le glaucome. Au niveau du système nerveux central, CLC protège de façon significative les cellules ganglionnaires rétinales (RGCs) de la dégénérescence. CLC montre des effets neuroprotecteurs sur les RGCs *in vivo* et pourrait être une option de traitement pour les maladies neurodégénératives chroniques telles que le glaucome (Schuettauf *et al*, 2005). Cependant, la faisabilité clinique nécessite d'être évaluée, surtout en considérant les effets immunologiques de la substance.

### **2. Effets stimulants de CLC sur les cellules B**

En effet, cette cytokine semble également avoir un rôle sur les organes lymphoïdes. Comme l'IL-6 (Akira *et al*, 1993), CLC démontre des effets sur la fonction des cellules B (Senaldi *et al*, 1999; Senaldi *et al*, 2002). Dans les cellules B primaires de souris, CLC stimule la production d'IgM, d'IgG et d'IgA, et induit la prolifération (Senaldi *et al*, 2002). CLC est un agent immunomodulateur, stimulant la fonction des cellules B et déplaçant la production des anticorps vers le type Ig Th2 (Senaldi *et al*, 2002). En plus de ces effets sur la fonction des cellules B normales, CLC a été récemment décrite comme un facteur de survie et de croissance efficace du myélome (Burger *et al*, 2003). De plus, ce groupe a également montré que CLC pouvait induire la croissance des cellules M1 (Burger *et al*, 2003). CLC apparaît comme une nouvelle cytokine avec des propriétés

immunorégulatrices. En effet, des souris traitées par CLC pendant 7 jours développent une hyperplasie des cellules B (Senaldi *et al*, 2002), une augmentation du taux sérique des immunoglobulines de type G et M, et une perte de poids de l'ordre de 8% (Senaldi *et al*, 1999).

### **3. Modulation neuroimmunocrine de la fonction corticotrophe**

Les mécanismes locaux de régulation autocrine/paracrine jouent un rôle critique dans la fonction corticotrophe (Arzt, 2001). De tels facteurs locaux impliqués dans cette régulation comprennent plusieurs cytokines de la famille gp130 (Arzt, 2001; Auernhammer and Melmed, 2001; Auernhammer *et al*, 2004). *In vivo*, CLC stimule chez la souris la sécrétion de corticostérone qui est également stimulée par toutes les autres cytokines de la famille de l'IL-6 (Benigni *et al*, 1996; Senaldi *et al*, 1999). CLC active cette fonction par un mécanisme dépendant de la voie JAK-STAT et cette action est régulée négativement par SOCS-3 (Auernhammer *et al*, 2003). CLC est un stimulateur efficace de la fonction corticotrophe avec une efficacité équimolaire comparable à celle du LIF, qui est un activateur bien établi de cette fonction (Benigni *et al*, 1996). CLC est exprimée dans les cellules folliculostellates qui sont hormonellement inactives à l'intérieur de la glande pituitaire et est régulée par les neuropeptides PACAP et VIP (Vlotides *et al*, 2004). Ces cellules stimulées peuvent sécréter CLC qui en retour régule la fonction corticotrophe dans une boucle paracrine à l'intérieur de la glande pituitaire. Ainsi CLC semble être un nouveau modulateur neuroendocrine efficace pour cette fonction pituitaire.

### **4. Dernières fonctions attribuées à CLC/CLF**

En activant la voie JAK-STAT dans le mésenchyme métanéphrique, CLC/CLF semble entraîner la conversion des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (Schmidt-Ott *et al*, 2005). L'hétérodimère CLC/CLF semble induire la conversion épithélio-mésenchymateuse et la néphrogénèse, suggérant ainsi que CLF agit comme un agoniste des cytokines.

Les comportements locomoteurs sont soumis aux rythmes circadiens contrôlés par le noyau suprachiasmatique. La précision du rythme circadien sur l'activité

locomotrice est générée par des actions concertées de multiples facteurs sécrétés par le système nerveux central, chacun régulant l'activité à un temps donné. CLC semble être synthétisée de façon rythmée (Kraves and Weitz, 2006). Elle est relâchée par les neurones du système nerveux central et agit sur les complexes récepteurs qui sont localisés autour du troisième ventricule pour inhiber l'activité locomotrice. Elle pourrait avoir un rôle dans la régulation des rythmes circadiens.

### **E. Le “Cold-Induced Sweating Syndrome”**

En 2003, Knappskog *et al*, ont décrit des mutations dans le gène humain de CLF provoquant un syndrome appelé « Cold-Induced Sweating Syndrome » (CISS). Ce syndrome a tout d'abord été décrit en 1978 par Sohar *et al* chez deux sœurs israéliennes. Ces patientes possèdent des mutations faux sens dans le gène de CLF et présentent une transpiration excessive à faible température au niveau de leur dos et de leur poitrine. Elles présentent également des anomalies morphologiques, incluant un haut palais arqué, une voix nasale, une cloison nasale détériorée et une incapacité à étendre complètement les coudes. Les patients décrits en 2003 par Knappskog, possèdent des mutations stop sur le gène de CLF menant à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle. Le phénotype est plus sévère que pour les sœurs israéliennes. En effet, ils possèdent en plus, une cyphoscoliose, des défauts dans la perception de la douleur et dans la sensibilité à la température, et surtout une absence d'appétit depuis la naissance (Knappskog *et al*, 2003).

Notre équipe a également participé en 2006 à la caractérisation d'un phénotype de type CISS chez un patient possédant des mutations fonctionnelles sur le gène de CLC (Rousseau *et al*, 2006). C'est une forme légèrement différente du syndrome CISS, elle est liée à une déficience en CLC, avec des caractéristiques cliniques similaires mais un peu plus bénignes. Le patient CLC<sup>-/-</sup> présente aussi des signes d'une neuropathie sensorielle bénigne. Ce patient présente une double mutation sur les deux allèles codant pour CLC. La première mutation entraîne un arrêt de la traduction de la protéine, menant si elle existe à une protéine tronquée non fonctionnelle. La seconde mutation en position 197 provoque un remplacement du résidu arginine par une leucine provoquant l'abolition de l'interaction de cette cytokine avec son récepteur (Rousseau *et al*, 2006). Le

phénotype de ce patient correspond à des anomalies squelettiques, une neuropathie sensorimotrice bénigne et une altération dans la thermorégulation. Ainsi, le rôle prévalent de CLC, tout comme CLF, dans le contrôle de la transpiration peut fournir une information utile quant aux investigations prochaines des désordres moins importants liés à la transpiration ou de l'hyperhidrose.

Alors que des pathologies avaient été attribuées à des mutations dans les récepteurs aux cytokines de type I, aucune mutation délétère n'avait encore été identifiée dans le gène d'une cytokine correspondante. L'absence d'un ligand inactivé dans une pathologie est clairement le reflet d'une large redondance fonctionnelle au sein des familles de cytokines. Le phénotype du dernier patient atteint du syndrome CISS est une évidence directe pour une fonction non redondante des cytokines de type I dans le développement humain dont l'inactivation mène directement à un phénotype pathologique.

## **F. Conclusion**

Les activités neuroprotectrices *in vitro* et *in vivo* du CNTF ont conduit à des essais cliniques dans des pathologies neurodégénératives, comme la sclérose latérale amyotrophique ou la chorée de Huntington. Le mode d'administration de la cytokine est un point important pour éviter des effets secondaires. Sa diffusion lente utilisant des systèmes encapsulés et insérés au sein même des tissus cibles est une voie prometteuse. CLC/CLF représente un second ligand naturellement sécrété pour le CNTFR. La spécificité de son action est contrôlée à la fois au niveau du site de synthèse à travers la fonction du transporteur membranaire de la partie CLF, mais également au niveau des tissus cibles puisque seule une forme membranaire de CNTFR autorise la réponse biologique. Son utilisation comme agent neuroprotecteur pourrait représenter un élément important dans le traitement des maladies neurodégénératives.

CLC, utilisant le CNTFR comme récepteur  $\alpha$ , contredit le dogme selon lequel la chaîne  $\alpha$  confère la spécificité du complexe récepteur pour la cytokine. La spécificité des récepteurs  $\alpha$  pour certaines cytokines pourrait donc ne pas être une propriété absolue du récepteur  $\alpha$  mais une propriété quantitative (Schuster *et al*, 2003).

Les études sur les animaux inactivés pour le gène de CLC représentent un modèle permettant de caractériser le rôle spécifique de CLC comme facteur neurotrophique *in vivo*.

### **III. La neuropoïétine, dernier ligand identifié du récepteur au CNTF**

L'équipe du Dr Gascan a récemment identifié une nouvelle cytokine de la famille de l'IL-6 appelée neuropoïétine chez la souris (Derouet *et al*, 2004). La neuropoïétine recrute le même complexe récepteur que celui du CNTF et du CLC/CLF et permet la prolifération de modèles de précurseurs neuronaux (les neurosphères) en association avec l'EGF et le FGF2 (Derouet *et al*, 2004). Par rapport à ces deux autres cytokines, la neuropoïétine a cependant un mode de sécrétion classique. Le profil d'expression de cette protéine est restreint au système nerveux central, et notamment dans les zones de développement des précurseurs neuronaux comme le neuroépithélium olfactif et rétinien. De plus, cette cytokine est exprimée uniquement durant le développement embryonnaire de la souris; en effet, aucun transcrit n'a pu être détecté chez l'adulte (Derouet *et al*, 2004). Cette cytokine a pu être identifiée dans plusieurs espèces dont le rat et le chimpanzé. Cependant, chez l'homme, il apparaît que le gène de la neuropoïétine présente une délétion de 8 nucléotides entraînant un décalage du cadre de lecture et par conséquent une protéine non fonctionnelle (Derouet *et al*, 2004). Cette délétion semble être conservée dans la population caucasienne, suggérant que le gène de cette cytokine a évolué en pseudogène chez l'homme (Derouet *et al*, 2004).



## **Chapitre 3. Activation des STATs et rôle des cytokines de la famille de l'IL-6 dans le cancer du sein**

Les trois chaînes du récepteur au CNTF (gp130, LIFR $\beta$  et CNTFR $\alpha$ ) ont été mises en évidence dans des lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que dans des tissus primaires de cancer du sein (Douglas *et al*, 1997). L'expression de ce récepteur et de ses ligands suggère que ces molécules pourraient être importantes dans la régulation de la croissance des cellules du sein. Lors du clonage de CLF, l'équipe du Dr Gauchat a identifié l'ARN messager de cette protéine dans des cellules fibroblastiques de glandes mammaires (Elson *et al*, 1998). De plus, les cytokines de la famille de l'interleukine 6 induisent un signal intracellulaire faisant intervenir les STATs qui sont des facteurs impliqués dans une multitude de maladies dont le cancer du sein (Clevenger, 2004). Nous allons tenter de démontrer le lien existant entre ces cytokines, ces facteurs STATs et le cancer, en particulier le cancer du sein. La description de la maladie sera présentée succinctement avant de détailler le rôle des facteurs STATs dans ces pathologies et l'implication des cytokines dans l'activation de ces voies de signalisation.

### **I. Le cancer du sein : une pathologie multifactorielle**

Le cancer est aujourd'hui un problème de santé publique majeur. Le nombre de nouveaux cas déclaré par an est estimé à 6 millions dans le monde (Garnier-Suillerot *et al*, 2001) tous types de cancers confondus.

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme (Descotes, 2002). Les grandes avancées en terme de compréhension des mécanismes de prolifération tumorale ont permis la mise en place de traitements efficaces. Cependant, le stade de développement de la maladie est très important dans la prise en charge thérapeutique. Diagnostiqué et traité précocement, le cancer du sein a un très bon pronostic en terme de survie; en revanche, plus la maladie est à un stade avancé, plus elle est difficile à guérir. Comme dans

beaucoup de processus de cancérisation, l'échappement thérapeutique, qui caractérise les stades très avancés de la maladie, intervient le plus souvent avec l'apparition des métastases (Descotes, 2002).

### **A. Physiologie et développement du sein**

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme. La glande mammaire est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, perfusé par les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes (Rudland *et al*, 1995). Une coopération permanente existe entre ces deux compartiments au cours du développement de la glande mammaire. Cette architecture se construit tout au long de la vie, du stade foetal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (oestrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance (Russo and Russo, 1998).

### **B. Rôle des hormones**

L'effet des oestrogènes est médié par les récepteurs aux oestrogènes (ER). Cependant les ER ne sont retrouvés que sur 6 à 7% des cellules épithéliales du sein normal (Anderson, 2002). L'expression des ER au niveau des cellules épithéliales varie en fonction du cycle menstruel (Balakrishnan *et al*, 1987). Il existe deux formes de récepteurs aux oestrogènes (Katzenellenbogen *et al*, 2000). Les deux isoformes du récepteur ont une localisation tissulaire variable : alors que ER $\alpha$  est exprimé assez spécifiquement dans les organes reproducteurs, ER $\beta$  est exprimé dans le système nerveux central (Kuiper *et al*, 1998b), le système cardiovasculaire, le système immunitaire, l'appareil urogénital, l'appareil gastro-intestinal, les os, les reins et les poumons (Arts *et al*, 1997; Kuiper *et al*, 1997; Osterlund *et al*, 1998). Les ligands naturels de ER sont le 17- $\beta$  œstradiol (E2) ainsi que ses dérivés ou métabolites estrone et estriol. Ces ligands naturels se lient au récepteur avec des affinités comparables pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Kuiper *et al*, 1997; Kuiper *et al*, 1998a) et permettent l'activation de la transcription de gènes

cibles. Le 17- $\beta$  œstradiol est synthétisé à partir du cholestérol des lipoprotéines dans les ovaires chez les femmes non ménopausées (Kuiper *et al*, 1998a). Chez les femmes ménopausées, il s'agit essentiellement de la conversion des androgènes par l'aromatase dans les tissus périphériques qui libère l'estrone (Kuiper *et al*, 1998a).

L'action des oestrogènes se fait donc à la fois de manière directe par l'action sur les cellules épithéliales, et indirecte par l'action sur les cellules mésenchymateuses qui sécrètent des facteurs de croissance (EGF, TGF- $\alpha$ , IGF, FGF et TGF- $\beta$ ) (Silberstein, 2001). L'importance de ER $\alpha$  comme cible thérapeutique dans les cancers hormono-dépendants a conduit à l'élaboration d'un grand nombre de ligands synthétiques (Thomas *et al*, 2004b).

### **C. Mécanismes de déclenchement tumoral**

La glande mammaire est un organe en évolution permanente sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. Ceci en fait un organe à part d'un point de vue du nombre de cellules en croissance et en différenciation, mais le rend plus susceptible aux transformations cancéreuses (Olsson, 2000). Comme tout mécanisme tumoral, la carcinogenèse mammaire résulte de l'acquisition par les cellules d'un certain nombre de caractéristiques : une autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance cellulaire, une évvasion du système de mort cellulaire programmée (apoptose), un potentiel de réplication illimité et une invasion tissulaire (potentiel métastatique) (Polyak, 2001).

La première étape de cancérisation est une phase d'initiation. Les cellules sont génétiquement anormales mais toujours contrôlées par l'environnement cellulaire via les jonctions serrées (gap-junction) (Polyak, 2001). Lorsque les cellules entrent dans la seconde étape dite de « promotion », elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance grâce aux pro-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire (Polyak, 2001). Cette acquisition d'indépendance peut se faire de plusieurs manières :

- soit la cellule est capable de synthétiser elle-même un certain nombre de facteurs : on parle alors de contrôle autocrine notamment avec une surexpression

d'« Insuline Growth Factor » (IGF), d'« Epithelial Growth Factor » (EGF) ou encore TGF- $\alpha$ ,

- soit il y a une surexpression des récepteurs transducteurs de signaux comme par exemple c-erb B2, le récepteur de l'EGF (Eccles, 2001), (Hynes and Lane, 2001),

- soit la cellule surexprime des facteurs de transcription, par exemple le pro-oncogène c-myc (Eccles, 2001; Hynes and Lane, 2001), ou les facteurs STATs.

#### **D. Classification**

La présence des récepteurs aux oestrogènes dans une tumeur a permis de mettre en évidence l'hormonosensibilité de cette tumeur. Les cancers du sein sont cliniquement classés en deux catégories : les cancers du sein dits ER+ et ceux dits ER-, selon le niveau d'expression dans une biopsie de tumeur (Descotes, 2002). Les tumeurs du sein ER+ représentent 50 à 80% de la totalité des tumeurs du sein et la proportion des tumeurs sensibles aux œstrogènes augmente avec l'âge. La présence de ER est actuellement corrélée avec un meilleur pronostic de survie (Descotes, 2002). Elle peut également permettre de prédire la réponse à une thérapie hormonale comme celle basée sur l'utilisation d'antioestrogènes tels que le tamoxifène (Descotes, 2002).

Dans certains cas (5 à 10% des cancers du sein) le développement tumoral est favorisé par la présence des mutations oncogéniques héréditaires qui touchent préférentiellement les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes tels que : BRCA1, BRCA2 ou p53 (Chodosh *et al*, 1999). On parle alors de cancers du sein héréditaires par opposition aux cancers du sein sporadiques. Le gène BRCA1 muté est retrouvé dans 40 à 45% des cas de cancer du sein héréditaires, et une telle mutation n'est quasiment jamais observée dans les cas de cancers sporadiques (Rosen *et al*, 2003). Un grand nombre de fonctions sont attribuées au gène BRCA1, notamment sa capacité à maintenir l'intégrité du génome, à contrôler le cycle cellulaire, ainsi que l'apoptose (Kubista *et al*, 2002). Parmi toutes ses fonctions, le gène BRCA1 possède la capacité d'interagir avec le proto-oncogène c-myc et d'inhiber ainsi la transformation cellulaire induite par c-myc. BRCA1 bloque aussi l'activité transcriptionnelle du récepteur à l'oestrogène ER- $\alpha$

en interagissant directement avec la partie N-terminale de ce dernier (Fan *et al*, 2001). BRCA1 se lie directement à p53 qui est une protéine régulant la progression du cycle cellulaire et induisant l'apoptose. Cette liaison provoque une augmentation de l'activité de p53 (Rosen *et al*, 2003). Le gène BRCA1 est donc un maillon essentiel dans le maintien de l'activité normale d'une cellule, c'est pourquoi les personnes qui possèdent une mutation héréditaire de ce gène présentent 50 à 80% de risque de développer un cancer du sein par la perte de l'allèle non muté du gène (Kubista *et al*, 2002).

## **E. Stratégies thérapeutiques**

### **1. Chirurgie**

La chirurgie est la technique la plus ancienne dans les cas de cancer du sein. Elle consiste en une ablation du tissu tumoral.

### **2. Radiothérapie**

La radiothérapie post-opératoire est réalisée après l'intervention chirurgicale. Elle utilise des rayons qui détruisent les cellules. Ainsi, des rayons de différentes énergies (photons, rayons X ou électrons) sont utilisés en fonction de la zone à traiter (Rang *et al*, 2003).

### **3. Chimiothérapie**

Les médicaments utilisés en chimiothérapie ont pour cible l'ADN ou les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Ils peuvent être classés en 4 familles selon leur mode d'action.

#### ***a. Les antimitotiques.***

Les alcaloïdes de la pervenche (vinblastine ou vincristine) et les taxanes (paclitaxel ou docetaxel) sont des antimitotiques qui inhibent la polymérisation de la tubuline, ce qui induit l'apoptose. Ils bloquent les cellules en métaphase en inhibant la dépolymérisation de la tubuline (Rang *et al*, 2003).

### ***b. Les agents alkylants***

Ce sont des molécules de synthèse qui, après activation hépatique ou tissulaire se lient de manière covalente à l'ADN, ce qui provoque une inhibition de la progression de l'ADN polymérase. Dans le cas du cancer du sein, c'est le cyclophosphamide qui est utilisé (Rang *et al*, 2003).

### ***c. Les antimétabolites***

Ils perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides. Les plus utilisés dans le cancer du sein sont le 5-fluorouracile (5-FU) et le méthotrexate (MTX) (Rang *et al*, 2003).

### ***d. Les inhibiteurs de la topoisomérase II***

Ces agents inhibent la religation des 2 brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaire au processus de réplication. Ceci provoque des cassures dans les brins d'ADN entraînant la mort cellulaire. Il s'agit de la famille des anthracyclines avec principalement l'adriamycine et l'épirubicine (Rang *et al*, 2003).

### ***e. Résistances***

La limite des traitements de chimiothérapie est l'apparition de résistances aux médicaments administrés avec des phénomènes de « cross résistance » (apparition de résistance à des molécules jamais administrées) (Descotes, 2002).

## **4. Hormonothérapie**

L'efficacité de l'hormonothérapie dépend de la présence ou non à la surface des cellules tumorales de récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone. ER $\alpha$  donnerait une réponse sur l'hormonosensibilité de la tumeur alors que ER $\beta$  permettrait de prévoir l'échappement aux traitements anti-oestrogéniques, le Tamoxifène n'ayant pas d'effets agonistes sur les ER $\beta$  (Descotes, 2002). L'absence de tels récepteurs est responsable de l'absence de réponse aux molécules administrées.

Il existe 3 types d'hormonothérapie :

- L'hormonothérapie compétitive avec les anti-oestrogènes. Ils bloquent l'action des oestrogènes en se fixant aux récepteurs oestrogéniques ER $\alpha$  des cellules tumorales. La molécule la plus largement utilisée à l'heure actuelle est le tamoxifène (ou 4HT) : c'est un agoniste dans certains tissus : utérus (augmente le risque de cancers de l'endomètre) (Fisher *et al*, 1994), os (maintien de la densité minérale osseuse) (Chang *et al*, 1996), et foie (augmente le risque de cancers hépatiques) (Dragan *et al*, 1994) mais un antagoniste dans d'autres tissus comme le sein.

- L'hormonothérapie additive avec la prise de progestatifs de synthèse. A forte dose, ils se comportent comme des anti-oestrogènes (Piccart *et al*, 2003).

- L'hormonothérapie inhibitrice avec les anti-aromatases. Cette thérapie consiste en une surrénalectomie chimique, qui se traduit par une inhibition de l'activité aromatase responsable de la conversion des stéroïdes surrénaliens en oestrogènes (Piccart *et al*, 2003).

## **5. Nouvelles stratégies thérapeutiques**

De nouvelles voies de traitements se développent en essayant d'apporter une spécificité en fonction des caractéristiques de la tumeur. C'est le cas des antagonistes des récepteurs de facteurs de croissance. Le plus étudié actuellement est le trastuzumab, qui est un anticorps humanisé dirigé contre le récepteur à l'EGF (HER2) (Sledge, 2001; McKeage and Perry, 2002). Cet anticorps est actuellement utilisé dans le traitement des patients atteints d'un cancer du sein métastatique dont les tumeurs surexpriment HER2 et qui ont reçu une ou plusieurs chimiothérapies. Il est aussi indiqué en combinaison avec le paclitaxel en thérapie de fond du cancer du sein métastatique (Seidel *et al*, 2000).

Une autre piste de traitement étudiée est l'immunothérapie génique. La transformation de cellules normales en cellules tumorales devrait faire de ces dernières des cibles préférentielles pour le système immunitaire. Or les tumeurs mettent en place des mécanismes pour échapper aux acteurs de l'immunité. Le but de l'immunothérapie génique est d'amplifier une réponse immune

antitumorale et de détourner les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire (Luftner *et al*, 2005).

Un autre axe sur lequel porte de nombreuses études est l'analyse des voies de signalisation et des facteurs cellulaires ou nucléaires qui sont constitutivement activés, soit par un oncogène, une cytokine ou un facteur de croissance, soit par autophosphorylation. Nous nous attarderons principalement sur les membres d'une famille de facteurs de transcription, les STATs, qui semblent avoir un rôle majeur dans le développement et le maintien de la prolifération tumorale.

## **II. Rôle des STATs dans l'oncogenèse du cancer du sein**

Les STATs appartiennent à une famille de facteurs de transcription qui régulent la croissance et la différenciation cellulaires, la prolifération, le développement, l'apoptose et l'inflammation (Bromberg *et al*, 1996; Coletta *et al*, 2004). Les STATs se retrouvent dans le cytoplasme dans un état latent ou inactif jusqu'à leur phosphorylation par les récepteurs associés aux kinases (Voir détails des mécanismes au Chapitre 1). De nombreuses études sur des lignées cellulaires, des modèles murins ou des tissus primaires humains ont démontré l'implication de ces facteurs dans l'oncogenèse du cancer du sein (Clevenger, 2004; Coletta *et al*, 2004). L'activité des STATs est modulée par plusieurs modifications post-traductionnelles et par des interactions protéines-protéines (Clevenger, 2004). Ces facteurs sont capables d'intégrer des signaux provenant de plusieurs réseaux de signalisation. En plus des JAKs qui activent les STATs, de nombreuses tyrosines kinases sont capables d'induire la signalisation des STATs (Jove, 2000). Cette famille de protéines est très importante car les STATs servent aussi bien de transducteurs du signal cytoplasmique que de facteurs de transcription nucléaires, permettant ainsi de convertir un stimulus apparu à la surface cellulaire en une altération dans le programme génétique (Jove, 2000). De plus, les STATs sont des intégrateurs importants de la signalisation activée par les récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance (Jove, 2000). Ces cytokines, hormones et facteurs de croissance utilisent les voies de signalisation



impliquant les STATs pour contrôler une grande variété de réponse biologiques, incluant le développement, la différenciation, la survie et la prolifération cellulaires. En considérant ce rôle important des protéines STAT dans ces processus cellulaires, il n'est pas surprenant qu'une inactivation inappropriée de la voie de signalisation des STATs soit fortement associée avec les phénomènes d'oncogenèse (Bromberg and Darnell, 2000). Il a été largement démontré que la signalisation induite par les STATs constitutivement activés mène à la transformation cellulaire et à la progression maligne de nombreux cancers humains (Bromberg and Darnell, 2000). La régulation et la fonction des STATs sont fortement dépendantes du type cellulaire et du stimulus activant les protéines. Le même membre de la famille des STATs peut entraîner des réponses conflictuelles en terme de prolifération cellulaire, de différenciation ou d'apoptose selon le contexte cellulaire (Jove, 2000).

Dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et dans des tumeurs, où la dérégulation de la croissance est fréquemment le point de départ de la transformation cellulaire, les protéines STAT, en particulier, STAT1, STAT3 et STAT5, sont phosphorylées ou activées de façon permanente (Turkson and Jove, 2000).

#### **A. STAT1 : un rôle modérateur de la croissance cellulaire**

Les souris inactivées pour le gène de STAT1 démontrent que cette protéine agit comme un modérateur de la croissance cellulaire dans l'animal entier (Durbin *et al*, 1996; Meraz *et al*, 1996). L'absence de STAT1 *in vivo* mène à l'augmentation de la formation des tumeurs, ce qui explique pourquoi l'activation de STAT1 entraîne fréquemment un effet antiprolifératif ou différenciant (Bromberg and Darnell, 2000). STAT1 a des effets pro-apoptotiques importants. En effet, il semblerait que les traitements comme la doxorubicine augmente l'activation de STAT1 et donc l'apoptose des cellules cancéreuses (Thomas *et al*, 2004a). STAT1 contrôle l'expression de protéines impliquées dans la présentation d'antigènes, affectant ainsi l'immunogénicité de la tumeur (O'Shea *et al*, 2002).

## **B. Rôle de STAT3 et STAT5 dans l'oncogenèse humaine**

Une activité anormale de certains membres de la famille des STATs, en particulier STAT3 et STAT5, est associée avec une grande variété de cancers incluant le cancer du sein (Turkson and Jove, 2000). De nombreuses publications ont montré que des échantillons cliniques de tumeurs contenaient des protéines STAT3 et STAT5 activées sans stimulation par un ligand connu (Turkson and Jove, 2000). De plus, le potentiel oncogénique de STAT3 et STAT5 peut être directement activé par des mutations ponctuelles.

### **1. Activation constitutive de STAT3**

Initialement, la transformation maligne par l'oncogène v-Src entraîne l'activation constitutive de STAT3 ce qui a suggéré qu'une activation aberrante des STATs pouvait jouer un rôle clé dans l'oncogenèse (Bromberg et al, 1998; Turkson et al, 1998). Un grand nombre de gènes cibles de STAT3 ont été identifiés, incluant la cycline D1, p21, c-myc et les membres de la famille Bcl qui ont des rôles importants dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaires (Turkson and Jove, 2000).

L'activation constitutive de STAT3 peut être due à la signalisation aberrante de l'EGF (Epidermal Growth Factor). Cependant en l'absence de stimulation par l'EGF, STAT3 est la protéine STAT majoritaire qui est activée dans les lignées de cancer du sein (Garcia *et al*, 2001). La cause de cette activation n'est pas connue. Pour tester l'efficacité de STAT3 comme seul agent responsable de la transformation, le groupe de Bromberg (Bromberg *et al*, 1999) a construit une forme constitutivement active de STAT3 où la dimérisation constitutive est atteinte par l'insertion de cystéines dans le domaine SH-2. Cette molécule dimérise spontanément et s'accumule dans le noyau où il peut lier l'ADN et conduire à la transcription (Bromberg *et al*, 1999). Les cellules de rat et de souris en culture peuvent être transformées et ces cellules sont alors capables de former des tumeurs dans les souris « nude ». En général, l'activation de STAT3 est associée avec la prolifération, la transformation cellulaire, et l'inhibition de l'apoptose. Cependant, il existe un certain nombre d'exemples où l'activation de STAT3 semble jouer un rôle dans la différenciation et entraîner l'apoptose

(Bromberg and Darnell, 2000). Ces observations ne sont pas nécessairement surprenantes puisque les protéines qui contrôlent la prolifération cellulaire sont étroitement liées à celles qui mènent à la mort cellulaire. La phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3 entraîne une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de cette protéine (Decker and Kovarik, 2000). Cette phosphorylation, requise pour une activation maximale de la signalisation, semble venir de plusieurs kinases incluant les MAPKs. Ceci met en évidence les interactions existant entre les différentes voies de signalisation et les implications possibles dans l'activation de STAT3 (Turkson and Jove, 2000). L'activation de la voie de signalisation des MAPK est augmentée de façon significative dans plus de 50% des cancers du sein par rapport à l'épithélium normal de sein et cette augmentation est associée avec un mauvais pronostic pour les patients (Mueller *et al*, 2000).

## **2. STAT3 et la formation de métastases**

Il a été démontré récemment que STAT3 pouvait avoir un rôle dans l'expression du gène de la vimentine. En effet, STAT3 semble pouvoir se lier sur ce gène, lever la répression et restaurer l'expression du gène (Wu *et al*, 2004). La vimentine appartient à la famille des filaments intermédiaires qui sont des protéines du cytosquelette. Cette protéine est exprimée très tôt dans l'embryon puis son expression est réprimée rapidement lors du développement. En général, l'expression de la vimentine coïncide avec la croissance cellulaire et est régulée par le cycle cellulaire (Franke *et al*, 1979; Wu *et al*, 2004). Par ses propriétés, la vimentine est un marqueur diagnostique pour la dissémination initiale des cellules épithéliales en cellules tumorales devenues migratoires et métastatiques (Wu *et al*, 2004). En dépit de son origine embryologique, la vimentine est activée de façon aberrante dans de nombreuses tumeurs, en particulier quand elles deviennent invasives et métastatiques (Bowman *et al*, 2000).

Il semble que l'activation maximale de STAT3 résulte de la coopération de différents récepteurs, comprenant les récepteurs aux facteurs de croissance, aux cytokines, mais aussi les tyrosines kinases qui ne sont pas des récepteurs. Ainsi, une activation constitutive de STAT3 est plus prédominante dans les cancers du sein hautement agressifs et métastatiques. En inhibant l'activation de STAT3, il

est possible de bloquer la progression des tumeurs mammaires malignes (Bowman *et al*, 2000; Garcia *et al*, 2001). STAT3 pourrait donc être une cible potentielle pour la découverte de médicaments anticancéreux et pour une intervention thérapeutique. En effet, bloquer la signalisation constitutive de STAT3 résulte en une inhibition de la croissance et une induction de l'apoptose des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Turkson and Jove, 2000).

### **3. STAT5 dans l'oncogenèse**

STAT5 aussi est impliquée dans la tumorigénèse, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Un certain nombre d'oncogènes comme la tyrosine kinase BCR/ABL ou v-src mène à une phosphorylation persistante de la tyrosine de STAT5 (Bromberg and Darnell, 2000). De nombreuses études indiquent que STAT5 peut activer la transcription de gènes associés à la progression du cycle cellulaire, la survie cellulaire, la transformation et l'angiogenèse (Yu and Jove, 2004). Ces observations ont principalement été réalisées dans les leucémies.

## **III. Rôle des cytokines de la famille de l'IL-6 dans le cancer du sein**

La progression tumorale est associée à un déséquilibre dans la prolifération cellulaire avec l'acquisition d'un potentiel invasif et métastatique ainsi qu'un échappement de la réponse immunitaire. Ces changements sont associés avec les altérations progressives dans la production de cytokines qui régulent la croissance (Purohit *et al*, 2002). La majorité des cancers du sein sont initialement dépendants des oestrogènes qui supportent leur croissance. La voie de synthèse des oestrogènes fait intervenir différentes enzymes comme l'aromatase dans les tissus périphériques. Une activité anormale de ces enzymes qui régulent la production des oestrogènes, implique des cytokines et des facteurs de croissance tels que le TNF- $\alpha$  (Tumour necrosis factor), l'IL-6, l'OSM, le LIF et l'IGF-1 (insulin-like factor Type I)(Purohit *et al*, 2002).

## **A. L'IL-6**

L'IL-6 est associée à une stimulation autocrine et paracrine de la prolifération cellulaire tumorale en régulant de façon positive les protéines anti-apoptotiques et angiogéniques dans les cellules tumorales (Jee *et al*, 2001). En effet, l'IL-6 est constitutivement exprimée par les cellules de carcinomes mammaires et les études d'immunohistochimie ont démontré l'expression de l'IL-6 dans le cytoplasme des cellules de cancer du sein (Krueger *et al*, 1991; Basolo *et al*, 1996). De plus, ces cellules expriment également le récepteur à l'IL-6 (Chiu *et al*, 1996; Douglas *et al*, 1997). L'IL-6 permet également de réguler positivement les récepteurs aux oestrogènes et l'expression de l'aromatase (Reed and Purohit, 1997). L'IL-6 affecte aussi la migration cellulaire en induisant la conversion des cellules tumorales d'un phénotype épithélial à un phénotype fibroblastique, et probablement en induisant une diminution de l'expression de E-cadhérine membranaire responsable de l'adhésion cellulaire et du phénotype épithélial (Asgeirsson *et al*, 1998). En plus du rôle de stimulateur de la synthèse des oestrogènes, différentes études ont confirmé l'importance de l'IL-6 dans les processus physiologiques associés à l'angiogenèse. IL-6 est un facteur pro-angiogénique supportant ainsi la croissance des nouveaux vaisseaux qui sont essentiels à la croissance de la tumeur (Purohit *et al*, 2002). Chez les patients atteints d'un cancer du sein récurrent, l'augmentation de l'IL-6 dans le sérum est associée à différentes résistances de traitement et à un mauvais pronostic de survie (Crichton *et al*, 1996; Conze *et al*, 2001; Bachelot *et al*, 2003; DeMichele *et al*, 2003; Salgado *et al*, 2003; Iacopetta *et al*, 2004).

Pour résumé, l'IL-6 agit indirectement en augmentant la production de VEGF par les cellules tumorales permettant une angiogenèse, et directement avec un rôle anti-apoptotique en induisant la prolifération cellulaire et le développement de métastases (Motro *et al*, 1990).

## **B. L'OSM**

L'OSM inhibe la prolifération et induit la différenciation des cellules de cancer du sein (Douglas *et al*, 1998). L'activation de ce récepteur abolit la stimulation des facteurs de croissance tels que l'EGF, et régule de façon négative

le proto-oncogène c-myc (Liu *et al*, 1997; Douglas *et al*, 1998). Parmi la famille de l'IL-6, l'OSM est l'inhibiteur le plus efficace de la prolifération des cellules de cancer du sein (Douglas *et al*, 1998).

### **C. Le LIF**

Le LIF est une cytokine pluripotente qui a des effets sur les cellules épithéliales. *In vitro*, il stimule la croissance des cellules de cancer du sein (Estrov *et al*, 1995; Dhingra *et al*, 1998). En effet, le LIF stimule la prolifération de lignées cellulaires ER+ de façon dose dépendante. Cet effet est direct et ne dépend pas des oestrogènes ou d'autres cytokines (Kellokumpu-Lehtinen *et al*, 1996). Le LIF agit comme un facteur de croissance autocrine ou paracrine sur le cancer du sein, du rein ou de la prostate (Kellokumpu-Lehtinen *et al*, 1996).

### **D. L'IL-11**

L'expression du gène de l'IL-11, retrouvée dans des tumeurs de sein invasives, suggère le potentiel de cette cytokine comme un facteur prédictif possible pour le développement de métastases osseuses (Sotiriou *et al*, 2001). L'IL-11 semble être un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Hanavadi *et al*, 2006).

### **E. Conclusion**

L'exploration de la biologie des tissus tumoraux a débuté, il y a plus de 30 ans, avec la découverte du concept des récepteurs hormonaux qui a permis de rendre compte de l'hormonodépendance des tumeurs mammaires. Les stratégies thérapeutiques disponibles à l'heure actuelle sont efficaces lorsque la maladie est diagnostiquée précocement (Descotes, 2002). En revanche, plus le stade est avancé, plus le pronostic est défavorable et le cancer du sein entraîne alors le décès de la patiente par des processus bien souvent métastatiques. Par la suite, les recherches ont permis d'identifier un certain nombre d'autres facteurs biologiques responsables des modalités évolutives des tumeurs mammaires en raison de leur implication dans les mécanismes de la progression tumorale. Ces facteurs tissulaires représentent des caractères biologiques mesurables dont le rôle est connu soit dans les mécanismes propres de la prolifération cellulaire soit

dans les réactions paracrines avec les cellules de l'environnement (activité protéasique ou angiogénique) qui participent à l'extension locale et métastatique. La liste des cytokines ayant un rôle potentiel dans le développement du cancer du sein est loin d'être exhaustive. En revanche, il est à noter qu'aucune donnée sur l'implication du CNTF dans le développement cancéreux n'est disponible dans la littérature.

Les études portant sur les protéines STAT continuent à révéler des informations aussi bien sur leur participation à l'activation de la transcription que sur les effets biologiques résultant de leur activation. A l'heure actuelle, il semble possible de conclure que STAT1 jouerait un rôle dans la restriction de la croissance alors que STAT3 et STAT5 favoriseraient la croissance de nombreuses tumeurs humaines. La fréquente co-activation de STAT1 et STAT3 par le même ligand et l'hétérodimère STAT1/STAT3 fréquemment observé laissent penser à une régulation basée sur un équilibre précis entre ces deux protéines. La perturbation de cet équilibre pourrait entraîner l'oncogenèse ou le phénotype cellulaire transformé (Bromberg and Darnell, 2000). Outre leur intérêt pronostique, on envisage désormais que certains de ces facteurs biologiques puissent être considérés comme des cibles thérapeutiques (Turkson and Jove, 2000).

## Résultats

### Chapitre 4. Rôle de CLC et du CNTF dans le cancer du sein

#### I. Introduction

Le cancer du sein est dans les pays développés la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme (Descotes, 2002). L'incidence du cancer du sein est réduite chez les femmes présentant une immunosuppression acquise ou médicamenteuse (Stewart *et al*, 1995). Comme la production de cytokine est également réduite chez ces patientes, cette observation supporte le concept que les cytokines ont un rôle important dans le cancer du sein, agissant éventuellement comme l'IL-6 par la stimulation de la synthèse d'oestrogènes (Reed and Purohit, 1997; 2001; Purohit *et al*, 2002). Lors du clonage de CLF, l'équipe du Dr Gauchat a identifié l'ARN messager de cette protéine dans des cellules fibroblastiques de glandes mammaires (Elson *et al*, 1998). Les trois chaînes du récepteur au CNTF (gp130, LIFR $\beta$  et CNTFR $\alpha$ ) ont également été mises en évidence dans des lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que dans des tissus primaires de cancer du sein (Douglas *et al*, 1997). L'expression de ce récepteur, et donc de ses ligands, suggère que ces molécules pourraient être importantes dans la régulation de la croissance des cellules du sein. CLC forme un complexe stable avec CLF et ce complexe est un ligand pour le CNTFR. De plus, le complexe CLC/CLF active la voie de signalisation JAK/STAT et pourrait être un facteur de déclenchement de l'activation d'une des protéines STAT. Sachant qu'une activation persistante de STAT3 est nécessaire et suffisante pour la transformation cellulaire et que les STATs sont souvent constitutivement activés dans l'oncogenèse, il est impératif de déterminer comment une activation persistante est atteinte et maintenue et de chercher de quelle manière une telle activation joue un rôle dans la transformation phénotypique (Bromberg and



Darnell, 2000). Nous avons donc voulu étudier le rôle de CLC dans le développement du cancer du sein.

La contribution des auteurs dans ce travail est la suivante : Jean-François Gauchat est le directeur du laboratoire ayant initié le projet. Hugues Gascan est le directeur du laboratoire avec qui nous avons collaboré. Yves St-Pierre nous a fourni des lignées cellulaires et a apporté ses critiques et ses corrections au projet. Josy Froger a produit les anticorps monoclonaux dirigés contre CLC. Sandrine Crabé a réalisé le marquage intracellulaire de la cytokine par cytométrie de flux (Figure 4). Laurence Preisser m'a formée sur la technique de PCR en temps réel. Sylvie Chevalier a été mon superviseur durant mon séjour dans le laboratoire avec qui nous avons collaboré. Elle a également réalisé le western présenté en Figure 6a. Ma contribution personnelle correspond à la production des vecteurs permettant de synthétiser la cytokine et de la protéine elle-même. Les autres figures n'étant pas citées précédemment sont issues de mon propre travail.

L'article qui suit a été soumis à la revue International Journal of Cancer.

## **II. ARTICLE 1 : Human breast cancer cell lines can co-express functional ciliary neurotrophic factor receptor and its ligand, cardiotrophin like cytokine.**

**Human breast cancer cell lines can co-express functional ciliary neurotrophic factor receptor and its ligand, cardiotrophin like cytokine.**

**Florence Guilhot<sup>1,2</sup>, Sylvie Chevalier<sup>2</sup>, Laurence Pressier<sup>2</sup>, Sandrine Crabé<sup>1</sup>, Josy Froger<sup>2</sup>, Yves Saint-Pierre<sup>3</sup>, Hugues Gascan<sup>2</sup> and Jean-François Gauchat<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, INSERM U743, Université de Montréal, Montreal, Canada.

<sup>2</sup>INSERM U564, Angers, France. <sup>3</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada.

<sup>4</sup>Address correspondence to Dr. Jean-François Gauchat, Département de pharmacologie, Pavillon Roger Gaudry, 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, QC, H3T1J4, Canada. E-mail : [REDACTED]

**Running title:** CLC and CNTFR in breast cancer cells

**Abbreviations:** Ab, antibody; AU, arbitrary units; CNTF, Ciliary Neurotrophic Factor; CNTFR, CNTF receptor; CLC, Cardiotrophin-Like Cytokine; CLF, Cardiotrophin- Like Factor 1; E-Cad, E-cadherin; ER, estrogen receptor; JAK, Janus kinases; LIF, leukemia inhibitory factor; LIFR $\beta$ , leukemia inhibitory receptor  $\beta$ ; mAb, monoclonal antibody; OSM, oncostatin-M; STAT, signal transducer and activator of transcription; Vim, vimentine.

## **ABSTRACT**

Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) has been observed in breast cancer and is believed to contribute to tumour growth. STAT-3 is a signalling element activated by the interleukin-6 (IL-6) family of cytokines. Expression of several receptors for this cytokine family in breast tumour has been reported. This includes the mRNA coding for the three subunits of the ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR). Two CNTFR ligands have been identified in human: ciliary neurotrophic factor (CNTF), a cytoplasmic cytokine and cardiotrophin-like cytokine (CLC) which form composite cytokines with the soluble receptor cardiotrophin-like factor (CLF) or CNTFR $\alpha$ . We detected the mRNA coding for CLC in all breast cancer cell lines and tumours examined. In the breast cancer cell line MCF-7, expression of CLC and CNTFR $\alpha$  was confirmed at the protein level and the activation of the CNTF receptor signalling cascade by its ligands directly demonstrated. These results suggest that co-expression of CNTFR and CLC could play a role in an autocrine loop participating in STAT-3 constitutive activation, as previously shown for other cytokines, notably IL-6. CLC is involved in the control of appetite, thermoception, nociception and, in rodents, circadian activity. Its production by tumour could therefore contribute to symptoms of breast cancer such as pain, circadian-system alteration and anorexia-cachexia syndrome.

## INTRODUCTION

Signal transducer and activator of transcription (STATs) are a family of cytoplasmic proteins identified for their role in relaying ligand induced activation of cytokine receptors signals to the nucleus <sup>1-3</sup>. Cytokine induced changes in receptor conformation, leading to activation of receptor associated Janus kinases (JAKs) by trans-phosphorylation <sup>1-3</sup>. Activated JAKs phosphorylate specific tyrosines of the signalling chains of cytokine receptors, creating docking sites for the recruitment of STATs <sup>1-3</sup>. Upon docking to the receptors, STATs are activated by tyrosine phosphorylation and form homo- or hetero-dimers via SH2 domain-phosphotyrosine interactions. These STAT dimers translocate to the nucleus where they bind the promoter of cytokine regulated genes and regulate their transcription <sup>1-3</sup>. Activated STATs can be oncogenic <sup>4</sup> and constitutive activation of STATs has been detected in a wide variety of human primary tumour specimen and tumour cell lines including breast cancer <sup>5, 6</sup>. In breast cancer cell lines, STAT-3 and STAT-1 are activated constitutively by a mechanism which is, at least partially, mediated by JAKs <sup>5</sup>. This activation is believed to contribute to the growth and survival of breast cancer cells <sup>5, 6</sup>. STAT-3 and STAT-1 are involved in the interleukin-6 (IL-6) family signal transduction <sup>7-10</sup>. The cytokines of the IL-6 family encompasses 8 known members regulating cell growth and differentiation in a large number of biological systems such as immunity, hematopoiesis, inflammation, and nervous system development <sup>7-10</sup>. All of these cytokines share one or both of the signal transducing receptor subunits gp130 or leukemia inhibitory receptor  $\beta$  (LIFR $\beta$ ) and their signalling cascade involves activation of STAT-1 and STAT-3 <sup>7-10</sup>.

Expression of mRNA encoding for IL-6 family receptors in breast cancer cell lines and biopsies has been reported <sup>11, 12</sup>. This includes mRNA coding the three chains of the CNTFR <sup>11</sup>. The tripartite CNTFR comprises one non-signalling glycosylphosphatidylinositol-anchored chain, CNTFR $\alpha$ , which first interacts with the ligands and two signalling chains, LIFR $\beta$  and gp130 <sup>13, 14</sup>. These two signalling chains LIFR $\beta$  and gp130 form, in the absence of CNTFR $\alpha$  functional receptors for two other members of the IL-6 family, LIF and oncostatin-M (OSM) <sup>15, 16</sup>. The presence of LIFR $\beta$  and gp130 on breast cancer cell lines was directly

demonstrated by LIF and OSM binding as well as cytokine response studies, whereas no effect of CNTF was detected <sup>11, 17</sup>.

Two CNTFR ligands have been identified to date in human : CNTF and CLC <sup>13, 18, 19</sup>. CNTF is a non-secreted, cytoplasmic cytokine which promotes the differentiation and survival of a wide range of nervous system cells <sup>18, 20</sup>. Notably, CNTF supports motor neuron survival *in vitro*, prevents the degeneration of axotomized motor neurons and attenuates motor neuron deficit in mice strains with neuromuscular deficiencies <sup>18, 20-24</sup>. CNTF has trophic effects on muscles, and induces weight loss centrally by regulating neurogenesis in feeding centers and peripherally by anti-obesogenic effects on skeletal muscles <sup>25-29</sup>.

We observed that CLC, also reported as novel neurotrophin-1 (NNT-1)/B cell-stimulating factor-3 (BSF-3) or CLCF1, forms a complex with the soluble cytokine receptor CLF (also referred to as NR6 or CRLF1) and that this composite cytokine is a second ligand for the CNTFR <sup>19</sup>. Alternatively, CLC can be co-secreted with CNTFR $\alpha$  to form a complex capable of binding and activating LIFR (LIFR $\beta$  and gp130) <sup>30</sup>. The existence of additional CNTFR ligand(s) was postulated in a study comparing the phenotypic consequences of disrupting the genes coding for CNTFR $\alpha$  and CNTF <sup>31, 32</sup>. Detailed phenotypic characterization of CLF deficient mice revealed a motor neuron loss similar to the one observed in CNTFR $\alpha$  mice suggesting that CLC/CLF is important during central nervous system development <sup>33, 34</sup>. The functional importance of this composite cytokine in human is directly indicated by the phenotype of patients suffering from mutations in genes coding either for CLC or for CLF, which lead to cold-induced sweating syndrome <sup>35-37</sup>.

The aim of the present study was to investigate the hypothesis that breast cancer cells can express both the functional tripartite CNTFR and CLC, with the potential to form an autocrine loop contributing to the constitutive activation of STAT-1 and STAT-3 and therefore to play a role in the development and progression of breast cancer. We studied expression of the mRNA coding for CLC/CLF and CNTFR $\alpha$  in six human breast cancer cell lines and seven human breast cancer biopsies. We showed that most cell lines express CLC and CNTFR $\alpha$  whereas expression of CLF was more restricted. As CLC can form an active

complex with either CLF or CNTFR $\alpha$ , this cytokine could therefore contribute to the constitutive activation of STAT-1 and STAT-3 in breast cancer cells. Expression of a functional LIFR (composed of the two signalling chains of the CNTFR, LIFR $\beta$  and gp130) and of CNTFR $\alpha$  mRNA had previously be demonstrated on the human breast cancer cell line MCF-7 <sup>11</sup>. We showed that MCF-7 expresses also the CNTFR $\alpha$  protein and that the CNTFR is functional in this breast cancer cell line. Thus inhibition of signalling cascades induced by CLC provides rationale for a therapeutic option for breast cancer.

## **MATERIALS and METHODS**

### **Cells and reagents**

The MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MCF-10a, MCF-7, SK-N-GP, T98G human cell lines were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS). Anti-CNTFR $\alpha$  (AN-56B and AN-E4biot) and neutralizing anti-gp130 (AN-144) monoclonal antibodies (mAb) were generated in our laboratory, as described<sup>19;30</sup>. The anti-STAT-3 and the anti-STAT-1 polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The mAb specific for phospho-705-STAT-3 and phospho-701-STAT-1, the antibodies detecting total and phospho ERK1/2 were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Goat anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-labelled immunoglobulins were from Biosource (MediCorp Inc, Montreal, QC, Canada).

### **Semi-quantitative RT-PCR**

Total RNA was isolated using Trizol<sup>TM</sup> according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). RNA quality and quantity were determined by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm and agarose gel electrophoresis analysis. First strand cDNA was synthesized from 2  $\mu$ g total RNA aliquots using random hexamers and Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcriptase was omitted in negative controls. PCR and RT-PCR amplifications were performed using Taq polymerase (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) following the recommendations of manufacturer. Reverse transcription products were subsequently amplified by 35 cycle PCR using primers for CLC (forward 5'-CCTGCAGTGCCAGCTCTCAATC-3' and reverse 5'-AGCTGCTGGAGGCTGCATCTTC-3'), for CLF (forward 5'-GCTGGCTCC-TGCCTCTATGTTG-3' and reverse 5'-GGTGGCTCCACTCACTCCAGAT-3'), for CNTF (forward 5'-ATGGCTTTTACAGAGCATTCAC-3' and reverse 5'-TGGGATCCCA-GTCTGATGAGAA-3'), for CNTFR (forward 5'-TGACCTGCTCAACGGCTCTC-3' and reverse 5'-AGGTGTCGCGGTTTCCTCAGT-3'). 30 cycles amplifications were used for

LIFR $\beta$  (forward 5'-CCAGTCCATAAGGCATGGTT-3' and reverse 5'-TCAGTACAAG-AGCAGCGGAAT-3'), and gp130 (forward 3'-ATTGACATGGACCAACCCAAGT-3' and reverse 5'-GGTATGCCTTTATGGATTGAGG-3'), whereas 25 cycles were used for actin (forward 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3' and reverse 5'-GGAG-CAATGATCTTGATCTT-3'). Amplified products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The PCR products were purified and sequenced using an ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser (PE Applied Biosystem, Streetsville, ON, Canada).

### **Real-time RT-PCR analysis**

cDNA samples from pooled normal tissues and organs (mammary gland, adrenal gland, bone marrow, cerebellum, whole brain, heart, kidney, lung, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle, spleen, testis, thymus, thyroid gland, trachea, uterus, colon w/mucosal lining and small intestine) were obtained from Clontech (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA).

Tumoral mammary gland cDNA samples were obtained from seven patients with breast cancer. Description of tumoral tissues were reported in Table 1. The experimental protocol was approved by the FRSQ-Réseau Cancer research committee. Tissues were obtained under protocols approved by the Canadian Committee of Human Research. First strand cDNA was synthesized using random hexamers and MMLV reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA) and subsequently divided in 5  $\mu$ L aliquot before freezing. Three reference genes were selected (GAPDH, HPRT1 and HSPCB) that belong to different functional classes to reduce the chance that the genes might be co-regulated. The primers were designed using the Primer 3 software <sup>38</sup> ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) and were based on RNA and DNA sequences found in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). RT-PCR amplification mixtures (15  $\mu$ L) contained 5  $\mu$ L of 1/20 dilution factor of cDNA for gene analysis (1/100 for housekeeping genes), 1X SYBR Green PCR MasterMix buffer (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada), and 0.2  $\mu$ M forward and reverse primers. Primer sequences were designed and validated by the Q-PCR platform (SCCAN, Université d'Angers, France) for GAPDH,, HPRT1, HSPCB,, CLC, CLF,



CNTF and CNTFR. Primers are available upon request. Reactions were performed and analyzed using an iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories) calibrated for use with SYBR Green. The cycling conditions comprised a first 3 min polymerase activation at 95°C and 50 cycles at 95°C for 15 sec, 55°C for 15 sec and 72°C for 15 sec with a single fluorescent measurement. Each assay was made in duplicate with a no-template control. All PCR efficiencies were above 88%. To measure expression levels accurately, normalization by multiple housekeeping genes instead of one was used <sup>39</sup>. Three housekeeping genes, GAPDH, HPRT1 and HSPCB were taken to normalized expression levels. The choice of three housekeeping gene leads to decrease phenotypic variations between samples. Furthermore, these genes are expressed with different levels in samples. Fold difference was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method normalized to 3 housekeeping genes.

#### **Generation of anti-CLC mAbs**

CLC cDNA <sup>19, 40</sup> was amplified by PCR and re-cloned in the bacterial expression vector pET24d (Novagen, VWR CANLAB, Mississauga, ON, Canada) in frame with the vector six his tag (6HIS Tag). CLC was expressed in *E. coli* BL-21 and purified by immobilized metal affinity chromatography as described previously for CNTF <sup>41</sup>. Monoclonal antibodies were produced in our laboratory (Plateforme Anticorps monoclonaux, Genopôle Ouest, Angers, France). Monoclonal antibodies directed against CLC were generated by immunizing Lewis rat with mouse CLC. Sp2/0 cells were used as partner fusion. Used antibodies were IgG1 (Froger J et al, unpublished results).

#### **Cell transfection and protein purification**

pcDNA5-FRT vectors encoding CLC/CLF were stably transfected in HEK 293 Flp-In cells (Invitrogen) using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). After 48h culture period, CLC/CLF transfected cells were selected with 100 µg /ml of hygromycine B until resistant clone apparition. CLC/CLF was subsequently purified from culture supernatant by affinity chromatography using an anti-

protein C affinity column (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Protein purity and concentration were determined by SDS-PAGE and silver staining.

### **Immunoprecipitations and Western-Blot analysis**

SK-N-GP, MCF-7 and T98G cells were lysed in lysis buffer [10 mM TrisHCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, proteinase inhibitors (1 µg/mL pepstatin, 2 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL aprotinin and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride) and 1% NP40]. Cell supernatants were then immunoprecipitated overnight using a monoclonal anti-CNTFR $\alpha$  mAb (AN-56B) at 10 µg/mL. Complexes were isolated using beads coupled to protein A (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and subjected to Western blotting analysis using a biotinylated anti-CNTFR $\alpha$  mAb (AN-E4) and polystreptavidin-peroxidase (Sanquin, Amsterdam, Nederland).

### **Tyrosine phosphorylation analysis**

After 24h serum starvation, MCF-7 cells were stimulated for 10 min with the indicated cytokine. Cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% Bromophenol Blue) and briefly sonicated. Lysates were cleared from insoluble material by centrifugation (3 min, 21000 g) and analyzed by Western blot using mAbs specific for phosphorylated forms of STAT-3, STAT-1 or MAPK before being incubated with the appropriate secondary antibody labeled with peroxidase for 1h. Membranes were stripped overnight in 0.1 mM glycine-HCl pH 2.8, and neutralized in 1 M Tris-HCl pH 7.6, before re-blotting with an antibody recognizing both activated and non-activated proteins. Signals were detected by enhanced chemiluminescence.

### **Flow cytometry analysis**

For the detection of binding to CNTFR, MCF-7 cells were successively incubated for 30 min at 4°C with indicated biotinylated cytokines (10 µg/mL), and signal was detected using an avidin-phycoerythrin-conjugated anti-mouse antibody or an isotype control antibody. An irrelevant biotinylated cytokine was

used as control. Fluorescence was subsequently analysed on a FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, Mountain View, CA).

For CLC intracellular staining, cells were fixed 20 min at room temperature in formaldehyde 2% final. After washing, cells were permeabilized 30 min at room temperature in saponin 1% final (Sigma Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada). Primary antibodies (anti-CLC M12 or isotype control) were added during 30 min at RT in saponin 0,5% final with or not irrelevant (CNTF) and relevant (CLC) cytokines at 10 µg/mL. After washing, cells were incubated with secondary antibody (anti-rat APC) (BD biosciences, Mississauga, ON, Canada) during 30 min at room temperature in saponin 0,5% final. The analysis was done on a FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, Mountain View, CA).

### **Proliferation assays**

MCF-7 cells were seeded in 96-well plates at a concentration of  $10^4$  cells per well in RPMI 1640 medium containing 1 % FCS and incubated at 37°C for 36 hours with cytokines. Serial dilutions of cytokines tested were performed in triplicate. Cells were pulsed with [ $^3\text{H}$ ] Thymidine (0.5 µCi per well) for 4h and the incorporated radioactivity determined as described <sup>42</sup>.

## RESULTS

### *Human breast cancer cell lines express mRNA for CNTFR chains and ligands*

Previous studies reported that human breast cancer cells express the mRNA coding for the three subunits of CNTFR<sup>11</sup>. We examined whether breast cancer cell lines could express simultaneously the mRNA coding for CNTFR and its ligands. Five human breast cancer cell lines (MDA-MB231, MDA-MB435, MDA-MB453, MDA-MB468 and MCF-7) and one immortalized breast cell line (MCF10a) were studied. Breast cancer cell lines can be classified according to the expression of estrogen receptor (ER)<sup>43</sup>, vimentin and E-cadherin<sup>44-47</sup>. Loss of estrogen dependence, of the breast tumour suppressor E-cadherin (E-Cad) and gain of vimentin (Vim) expression is correlated with increased tumour invasiveness<sup>47</sup>. The characteristics of the breast cancer cell lines studied were: MCF-7 (ER<sup>+</sup>, E-Cad<sup>+</sup>, Vim<sup>-</sup>), MDA-MB468 (ER<sup>-</sup>, E-Cad<sup>+</sup>, Vim<sup>-</sup>), MDA-MB453 (ER<sup>-</sup>, E-Cad<sup>-</sup>, Vim<sup>-</sup>), MDA-MB435 (ER<sup>-</sup>, E-Cad<sup>-</sup>, Vim<sup>+</sup>) and MDA-MB231 (ER<sup>-</sup>, E-Cad<sup>-</sup>, Vim<sup>+</sup>)<sup>48-50</sup>.

Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that gp130 and LIFR $\beta$  mRNA were expressed in all breast cell lines tested (Figure 1a), confirming a first report<sup>11</sup>. Results on the expression of the mRNA coding for CNTFR $\alpha$  analysed by semiquantitative (Figure 1a) or quantitative (Figure 1b) RT-PCR were also in line with those reported by the group of Douglas<sup>11</sup>, with the highest level of expression in the ER<sup>+</sup> cells, less invasive breast cancer cell line MCF-7 and the lowest expression in the most invasive, ER<sup>-</sup> cell lines (Figure 1b). Interestingly, CNTFR $\alpha$  mRNA was also detected, but to a lesser level in a transformed breast cell line MCF-10a (Figure 1a and b).

We next analyzed the expression of the mRNA coding for the two CNTFR ligands, CNTF and the composite cytokine CLC/CLF (Figure 1a and b). CLC and CNTF mRNA were detected by semi-quantitative RT-PCR in all cell lines examined (Figure 1a). The level of CLC and CNTF could be measured by quantitative RT-PCR in all studied breast cancer cell lines (Figure 1b). The highest CLC and CNTF mRNA levels were observed in MDA-MB-235, one of the cell lines examined expressing the most invasive phenotype (ER<sup>-</sup>, E-Cad<sup>-</sup>, Vim<sup>+</sup>). Unlike CLC and CNTF, the expression of CLF mRNA was inversely proportional with the

invasiveness of cells in the six cell lines examined <sup>48-50</sup>, with the highest level being detected in MCF-7 cells (ER<sup>+</sup>, E-Cad<sup>+</sup>, Vim<sup>-</sup>) with the lowest degree of invasion potential (Figure 1a and b).

*Real Time PCR analysis of CLC, CLF, CNTF and CNTFR mRNA levels in human tissue and breast cancer biopsies.*

These observations indicate that the mRNA coding for CNTFR and its ligands can be co-expressed in breast cancer cell lines. We next determined whether mRNA coding for CNTFR ligands could also be detected in breast tumour samples. Normal breast tissues and RNA from breast tumours were studied for CNTF receptor and CNTFR ligands expression. Breast tumour RNA aliquots were provided by the FRSQ-network cancer collection. This RNA was isolated from microdissected tumour tissues samples and therefore the amount of RNA was too low for direct quantification of the total RNA concentration. As the aliquots of RNA made us available by the FRSQ-network cancer collection for the present study were limiting, we used only real-time PCR to assess expression, with a normalization factor based on three commonly used housekeeping genes (GAPDH, HPRT1, and HSPCB). Selected genes belong to different functional classes, which significantly reduces the chance that genes might be co-regulated <sup>39</sup>. The expression level of these three internal control genes was determined in all samples. Expression of CNTFR $\alpha$  mRNA was detected in 5 out of 7 primary breast cancer samples (Figure 2). Expression of CLC mRNA was ubiquitous in clinical tumour samples tested (Figure 2). Similarly, CLF expression was widely distributed among the samples and 4 out of 7 led to a detected CLF transcript (Figure 2). As observed in breast cancer cell lines (Figure 2), CLF mRNA had a more restricted expression pattern, being detectable in only 4/7 tumours (Figure 2). In contrast, we could succeed in detecting CNTF transcript, strongly suggesting an absence of the corresponding protein in tumour breast samples. The level of CNTF was below detection limit with the amount of cDNA available for the measurement (data not shown).

As CLC mRNA was not only detected in breast cancer cell lines but also in the transformed breast cell line MCF-10a, we assessed expression of CLC, CLF and CNTFR mRNA in human mammary gland using human cDNA obtained from

Clontech (see material and methods). This analysis indicated that CLC, CLF and CNTFR $\alpha$  mRNA were markedly expressed in mammary gland in comparison with other human organs (Figure 3). Expression of CNTF mRNA was very low in all tissues examined, including mammary gland (data not shown). These results suggest that expression of the mRNA coding for CNTFR and its secreted ligand CLC/CLF in breast cancer is not linked to tumorigenesis but rather reflects a property of normal mammary gland.

*The breast cancer cell line MCF-7 expresses intracellular CLC protein*

To investigate if expressed CLC mRNA in breast cancer is translated in the corresponding protein, we used the MCF-7 cell line as model. We focused our study on CLC as CLF is required only for CLC secretion and as CLC can alternatively be secreted as a complex with CNTFR $\alpha$  <sup>30</sup>. CLC mRNA can be detected in MCF-7 (Figure 1). To show expression of CLC at the protein level, we generated specific monoclonal Abs (see material and methods). Using the human kidney cell line HEK-293 derivative 293-Flp<sup>TM</sup> stably transfected with human CLC cDNA, we showed that one of these mAbs (M12) can be used to detect CLC by intracellular staining and flow cytometry (Figure 4a). As expected, no signal was observed in untransfected HEK-293 (Figure 4a). Intracellular staining and flow cytometry was used to assess CLC protein expression in MCF-7. When secretion was prevented by treatment with brefeldin A and cells were permeabilized, fixed and stained with mAb M12, a fluorescence signal was detectable by flow cytometry (Figure 4b). It could be decreased by competition with recombinant CLC but was unaffected by the presence of recombinant CNTF (Figure 4c). This indicates that the fluorescence signal observed in MCF-7 incubated with mAb M12 was specific for CLC (Figure 4).

*The breast cancer cell line MCF-7 expresses a functional CNTFR*

To investigate the functional activity of the tripartite CNTFR, we used again MCF-7 as it expressed the highest level of CNTFR $\alpha$  mRNA among the breast cancer cell line tested (Figure 1). Low level of LIFR ( $\leq 100$  receptors per cell), formed by two CNTFR signalling subunits LIFR $\beta$  and gp130, has been reported at

the surface of this cell line <sup>11</sup>. Using immunoprecipitation and Western blot analysis, we could also detect CNTFR $\alpha$ , albeit at a much lower level than in the human SK-N-GP neuroblastoma cell line used as positive control (Figure 5). The CNTFR $\alpha$  negative T98G glioblastoma cell line was included as negative control. Whereas expression of CNTFR $\alpha$  can be detected by flow cytometry in SK-N-GP <sup>19</sup>, it was below detection limit by this method in MCF-7 cells (data not shown).

In order to evaluate the capacity of CNTFR to trigger a signal in MCF-7 cells, we investigated the effect of receptor activation on proliferation and on activation of the downstream JAK/STAT signalling pathway. Treatment of MCF-7 with human recombinant CNTF modulated cell line proliferation in a dose-dependant manner (Figure 5b). No effect was detected when the cells were incubated with similar doses of IL-4, used as negative control.

We next studied the induction of STAT-3, STAT-1 and MAPK tyrosine phosphorylation, two signalling pathways recruited by CNTFR <sup>51</sup>. Increase in STAT-3, STAT-1 and MAPK phosphorylation could be detected in response to activation of MCF-7 by CNTF or by the composite cytokine CLC/CLF and this response was dose dependant (Figure 6a). To show that the signalling response was specific we used a blocking mAb, AN-144 directed against one of the tripartite CNTFR signalling subunit, gp130 <sup>52</sup>. Cytokine-induced up-regulation of STAT-1 and STAT-3 phosphorylation could be completely prevented by the inclusion of the anti-gp130 mAb during cell stimulation by the cytokines (Figure 6b). LIF and single chain IL-6-IL-6R $\alpha$  fusion [capable of triggering signalling through gp130 homodimers <sup>9</sup>] were included as positive controls for these experiments (Figure 6).

## DISCUSSION

Binding and functional responses to LIF and OSM were directly demonstrated in breast cancer cell line <sup>11, 17</sup>. As the two chains of LIFR and OSMR represent the transducing compartment of CNTFR <sup>14-16</sup> and expression of the mRNA coding for CNTFR third chain, we examined if breast cancer cell lines and breast cancer biopsies could express simultaneously CNTFR and its ligands. We detected the mRNA coding for the three subunit of CNTFR (CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$ ) in the majority of the breast cancer cell lines tested. When our study was extended to tumor samples, we detected expression of CNTFR $\alpha$  mRNA in five out of seven breast cancer tumors, confirming CNTFR expression in breast cancer <sup>11</sup>. We did not assess the expression of gp130 and LIFR $\beta$ , as such expression had been demonstrated previously in breast cancer biopsies <sup>11</sup> and the amounts of tumor RNA accessible for our quantifications were very limiting. This prompted us to evaluate expression of the receptor ligands, CNTF and CLC. Interestingly, CLC mRNA was expressed by most breast cancer cell lines and all tumour samples examined. Using MCF-7 as model, we could detect CLC protein expression using intracellular cytokine staining with a specific anti-CLC mAb and flow cytometry.

CLC is secreted as a composite cytokine with the soluble cytokine receptor CLF <sup>19</sup>. Expression of the CLF mRNA was more restricted than CLC in cell lines and tumour biopsies. However, formation of a complex with CLF might be dispensable for CLC autocrine activity in cells expressing CNTFR $\alpha$  : CLC can form an alternative complex with CNTFR $\alpha$  which binds and activates LIFR <sup>30</sup>. Such complex could activate breast cancer cells in an autocrine manner. Alternatively, the CLC/CNTFR $\alpha$  complex might even be released through CNTFR $\alpha$  GPI anchor cleavage by phospholipases to act in a paracrine manner <sup>30, 53</sup>.

We therefore examined if CNTFR expressed by breast cancer cells is functional using the MCF-7 cell line as model. The presence of the CNTFR $\alpha$  chain could be detected by Western blot analysis. This, together with previous reports demonstrating that MCF-7 possess functional LIFR (gp130 and LIFR $\beta$ ) <sup>11</sup>, indicated that this breast cancer cell line expressed the three chains of the CNTFR. We then showed that CNTFR was functional: incubation of MCF-7 with



any of the two CNTFR ligands, CNTF or CLC/CLF induced a marked proliferation and potent activation of STAT-1, STAT-3 and of the MAPK pathway. This signalling could be blocked using an anti-gp130 mAb, indicating that it was specific.

Our observation that breast cancer cells can express both CLC and functional CNTFR show that this cytokine has, like other members of the IL-6 family, a potential role as an autocrine growth factor in breast tumorigenesis. Expression of the mRNA coding for the IL-6 family receptor signalling subunits gp130, LIFR $\beta$  and non-signalling subunits IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$  and CNTFR $\alpha$  in breast cancer cell lines and biopsies was reported previously <sup>11, 12</sup>. In this family of cytokines, strong evidences for a role of IL-6 in breast cancer have been accumulated. IL-6 has been shown to be produced by breast cancer cells <sup>12, 54, 55</sup> and to be increased in serum from patients with metastatic breast cancer <sup>56-59</sup>. Presence of high levels of serum IL-6 was correlated with shorter survival of patients <sup>56-59</sup>. Furthermore, it has been proposed that polymorphism in the IL-6 gene might be associated with a higher breast cancer risk <sup>60, 61</sup>, a finding which is however controversial <sup>62</sup>. STAT-1 and STAT-3 constitutive activation is frequent in breast cancer <sup>5, 6</sup> and these two transcription factors represent signalling transducer for the IL-6 family receptors <sup>7-9</sup>.

We detected mRNA coding for both cytokines and receptors in normal breast tissue and expression seems to be lost in some of the most invasive breast cancer cell line. Expression of the two signalling chains of CNTFR in normal breast was reported previously <sup>63</sup>. Altogether, these observations suggest that CLC-CNTFR potential autocrine loop might be lost during tumour evolution toward hormone and growth factor independence. In line with this hypothesis, it has been suggested that CNTFR and ER might be co-regulated <sup>11</sup>. In such case, the potential of CNTFR signalling inhibition as adjuvant therapy for breast cancer might be restricted to the initial hormone and growth factor dependent phase of tumour development. In this regard, CLC would differ from IL-6 which has been reported to be expressed by multidrug resistant breast cancer cells. Whereas our knowledge on the functions of CLC remains fragmentary, patients with mutations inactivating CLC binding site I (involved in CNTFR binding) or CLF have skeletal

abnormalities, sensorimotor neuropathy and alteration in nociception and thermoception <sup>35-37</sup>. CLC produced by breast tumour might therefore have exocrine effects and contribute to cancer-linked bone destruction and pain disorders. Studies in rodent indicate that CLC, like CNTF induce weight loss <sup>40</sup> and could play a role in cancer anorexia-cachexia syndrome, together with other cytokines such as IL-6 <sup>64</sup>. In mice, CLC has been shown to play a role in control of circadian control of mammalian locomotor activity <sup>65</sup>. CLC produced by tumours could thus be a factor in the circadian-system alteration observed in breast cancer affected patients <sup>66, 67</sup>.

The initial growth of breast cancer cells is likely regulated by a balance between steroidal hormones, members of the EGF, FGF and IGF families, and cytokines such as IL-6 and CLC/CLF. The parallel expression of ligands and receptor for these cytokines raises the possibility that these molecules play a role in normal and malignant breast cell biology and offers new treatments opportunities <sup>68</sup>.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to the FRSQ-network cancer collection for the access to breast cancer tumour samples and to Dr M. Alaoui-Jamali, Division of Experimental Medicine, Mc Gill University, Canada, for kindly providing the human breast cancer cell lines. This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (MOP-57832). JFG is a Canada Research Chair recipient and FG was supported by a one year grant from the International Council of Canadian Studies.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Analysis of CNTFR ligands and receptor chain mRNA expression in breast cancer cell lines.**

Total RNA isolated from the ER negative breast cancer cell lines MB-MDA-231, MB-MDA-435, MB-MDA-453, MB-MDA-468, the ER positive breast cancer cell lines MCF-7 and the breast epithelial cell line MCF-10a was analysed for the expression of the indicated mRNA by semi-quantitative (panel **a/**) or quantitative (panels **b/**) RT-PCR. For semi-quantitative RT-PCR, control samples, in which reverse transcriptase was omitted from the initial cDNA synthesis reaction, were included (lanes RT-). For the quantitative real-time RT-PCR, results were normalized to three housekeeping genes (GAPDH, HPRT1 and HSPCB) and are representative of two experiments. Relative quantities are indicated with arbitrary units (AU).

### **Figure 2. Analysis of CLC, CLF and CNTFR $\alpha$ mRNA expression in breast cancer biopsies by real-time RT-PCR.**

P127, P122, P121, P111, P110, P53 and P46 indicate breast tumour samples obtained from different patients. Results were normalized as indicated in Figure 1 and are representative of two experiments. Error bars were indicated were calculated as mean  $\pm$  s.e. mean (n=2).

### **Figure 3. Analysis of CLC, CLF and CNTFR $\alpha$ mRNA expression in human organ and tissue samples by real-time RT-PCR.**

Commercial cDNA were used to compare CLC, CLF and CNTFR $\alpha$  mRNA levels in mammary gland with the indicated organs and tissues. Results were normalized as indicated in Figure 1 and are representative of two experiments.

### **Figure 4. CLC can be detected by flow cytometry in permeabilized MCF-7 using anti-CLC mAb M12.**

**a/** HEK 293 Flp-In™ stably transfected with a pCDNA5 bicistronic derivative coding for CLC, CLC/CLF or with empty vector were fixed, permeabilized and

successively incubated with the anti-CLC mAb M12 or isotype control and phycoerythrin-conjugated anti-rat Ab.

**b/** MCF-7 cells were fixed, permeabilized and successively incubated with the anti-CLC mAb M12 and phycoerythrin-conjugated anti-rat Ab.

**c/** MCF-7 cells were fixed, permeabilized and successively incubated with the anti-CLC mAb M12 in the presence or absence of the indicated cytokines. The mAb was revealed using phycoerythrin-conjugated anti-rat Ab.

**Figure 5. CNTFR expressed by MCF-7 cells is functional.**

**a/** Analysis of CNTFR $\alpha$  expression by Western blot. Lysates from the MCF-7 cell line, the glioblastoma T98G (used as CNTFR $\alpha$  negative control) and the neuroblastoma SK-N-GP (used as CNTFR $\alpha$  positive control) were subjected to immunoprecipitation with anti-CNTFR $\alpha$  mAb (AN-56B). The immunoprecipitated fractions were analysed by Western blot using the biotinylated anti-CNTFR $\alpha$  mAb AN-E4.

**b/** CNTF induces the proliferation of MCF-7 cells. MCF-7 cells were incubated in the presence of the indicated cytokines. After 72h, a [ $^3$ H]-thymidine pulse was performed and the amount of incorporated radioactivity measured with a  $\beta$ -counter. Proliferation measurements were performed in triplicate. The figure is representative of three independent experiments. Error bars represent the SEM.

**Figure 6. CNTF and CLC/CLF activate the JAK-STAT signalling pathway in MCF-7 cells.**

**a/** CNTF and CLC induced STAT3 and MAPK phosphorylation in a dose dependant manner. The MCF-7 cell line was incubated for 10 min in the presence of indicated concentrations of CNTF, CLC/CLF or without cytokine. After cell lysis in 1% NP-40, tyrosine phosphorylation of STAT-3 (panel P-STAT3), MAPK p44 and p42 (panel MAPK-P) was analysed by Western blotting using the appropriate anti-phosphotyrosine Abs. After stripping, the membrane was re-stained using an anti-STAT-3 or an anti-MAPK polyclonal Ab (panels STAT3 and MAPK).

**b/** Inhibition of STAT-3 and STAT-1 phosphorylation by neutralizing gp130. The MCF-7 cell line was incubated for 10 min in the presence of 50 ng/ml of CNTF,

LIF, or IL-6/ soluble IL-6R $\alpha$  complex or without cytokine. After cell lysis in 1% NP-40, tyrosine phosphorylation of STAT-3 (panel P-STAT3) and STAT1 (panel P-STAT1) was analysed by Western blot using the appropriate anti-phosphotyrosine Abs. After stripping, the membranes were re-stained using an anti-STAT-3 or an anti-STAT-1 polyclonal Abs (panels STAT3 and STAT1).

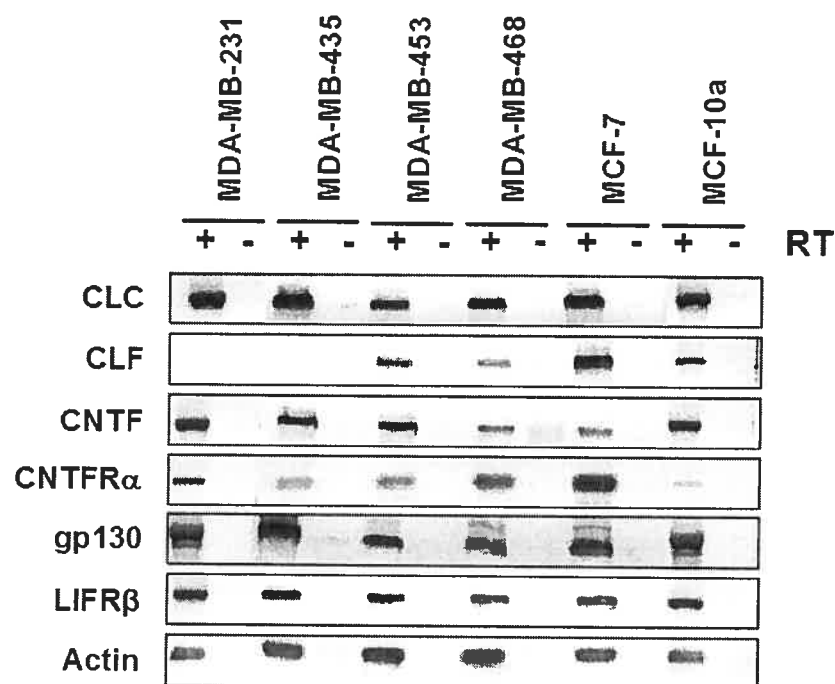
**TABLES****Table 1. Characteristics of clinical breast tissue samples**

Patients	ER/PR Status	Her-2/neu Status	Nb of pregnancies	Age	Tumor size (cm)	Grade
127	weak/neg	Neg	0	69	3	3
122	weak/neg	Pos	1	43	2	3
121	neg/neg	Neg	2	36	2	3
111	pos/pos	Na	4	69	1.5	3
110	weak/pos	Neg	0	65	3	2
53	pos/pos	Neg	0	91	3	2
46	pos/pos	Na	1	52	1.5	1

ER/PR: Estrogen receptor/Progesterone receptor; neg: negative; pos:positive; na: unknown;

**Figure 1**

**a**



**b**

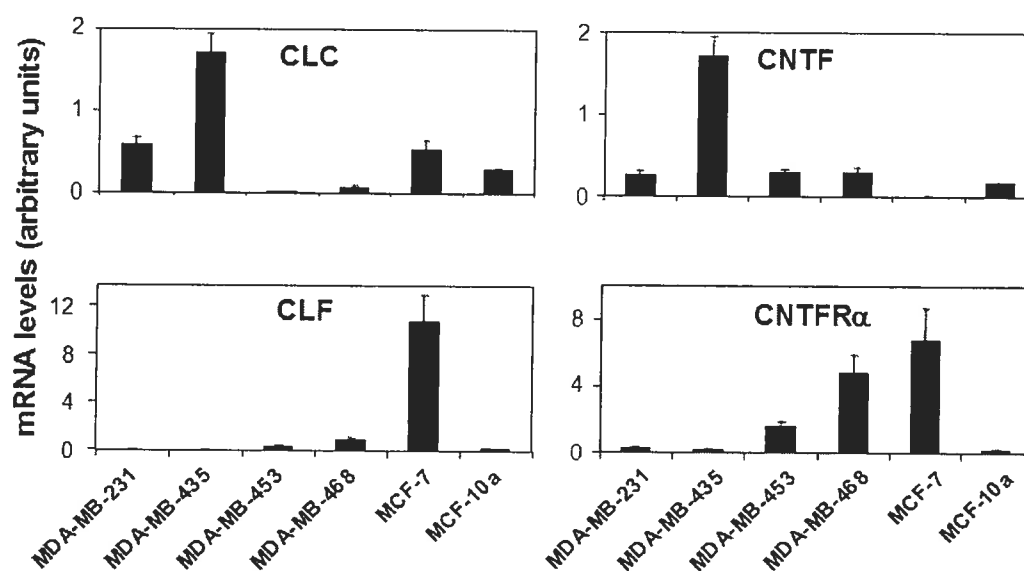




Figure 2

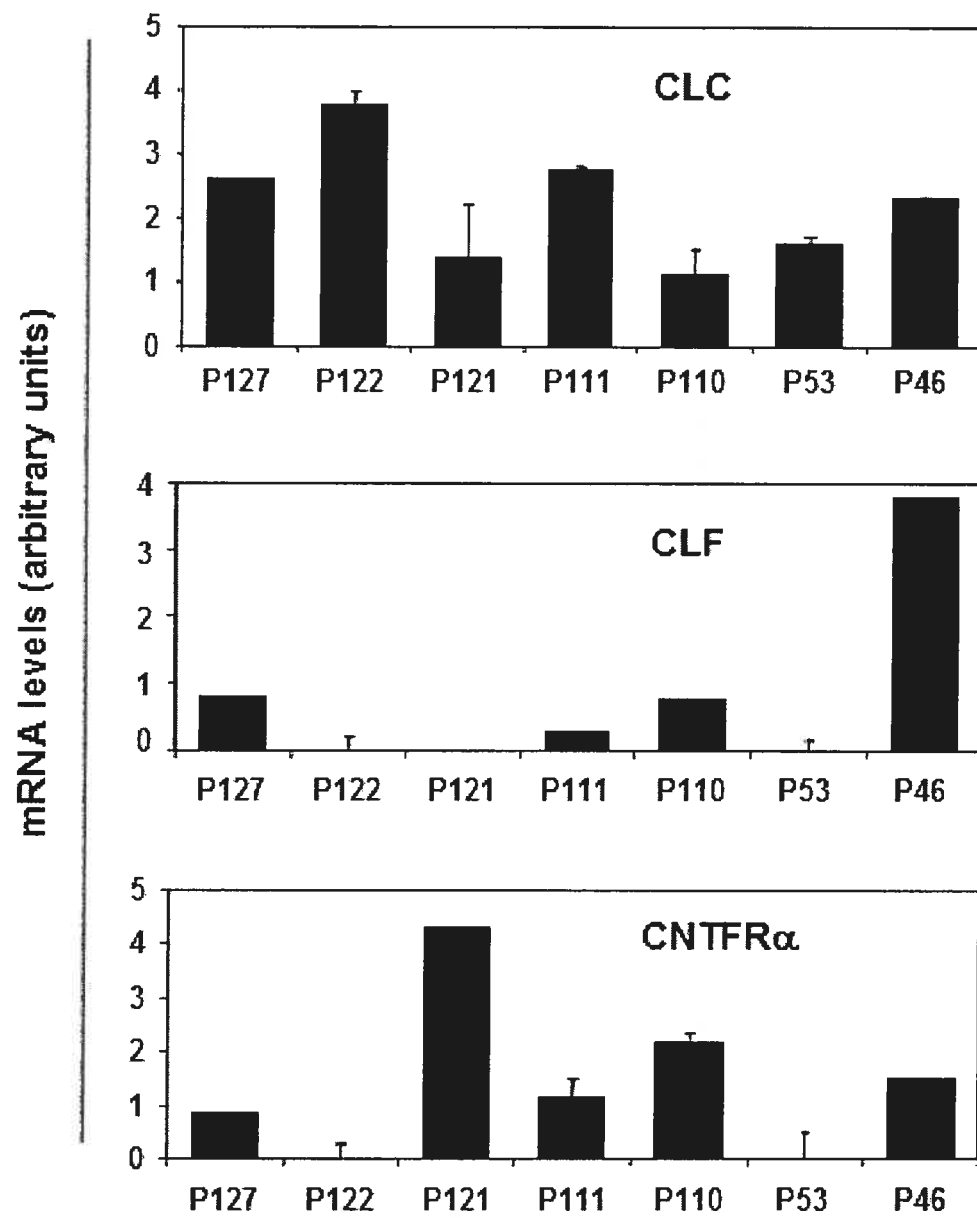
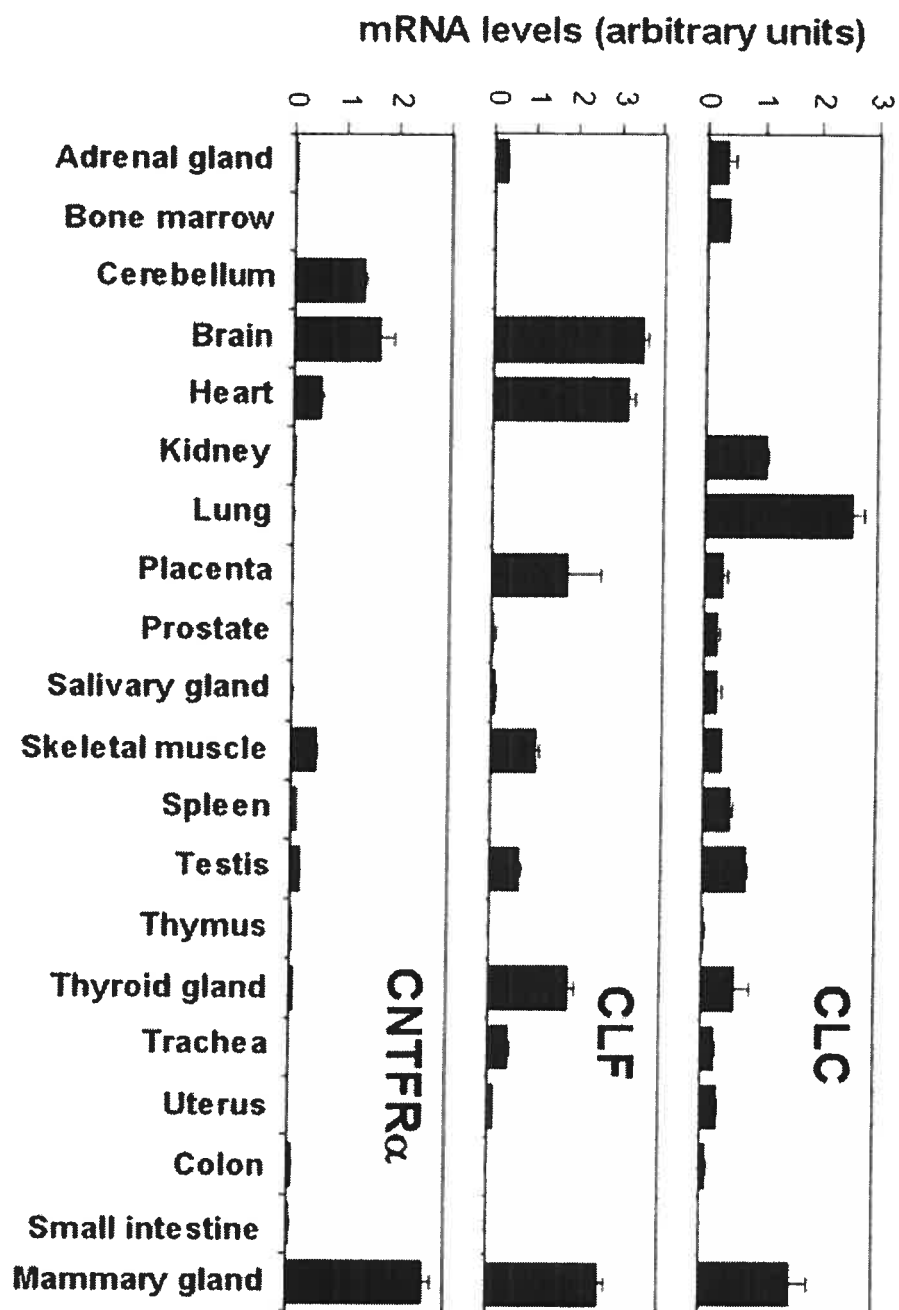
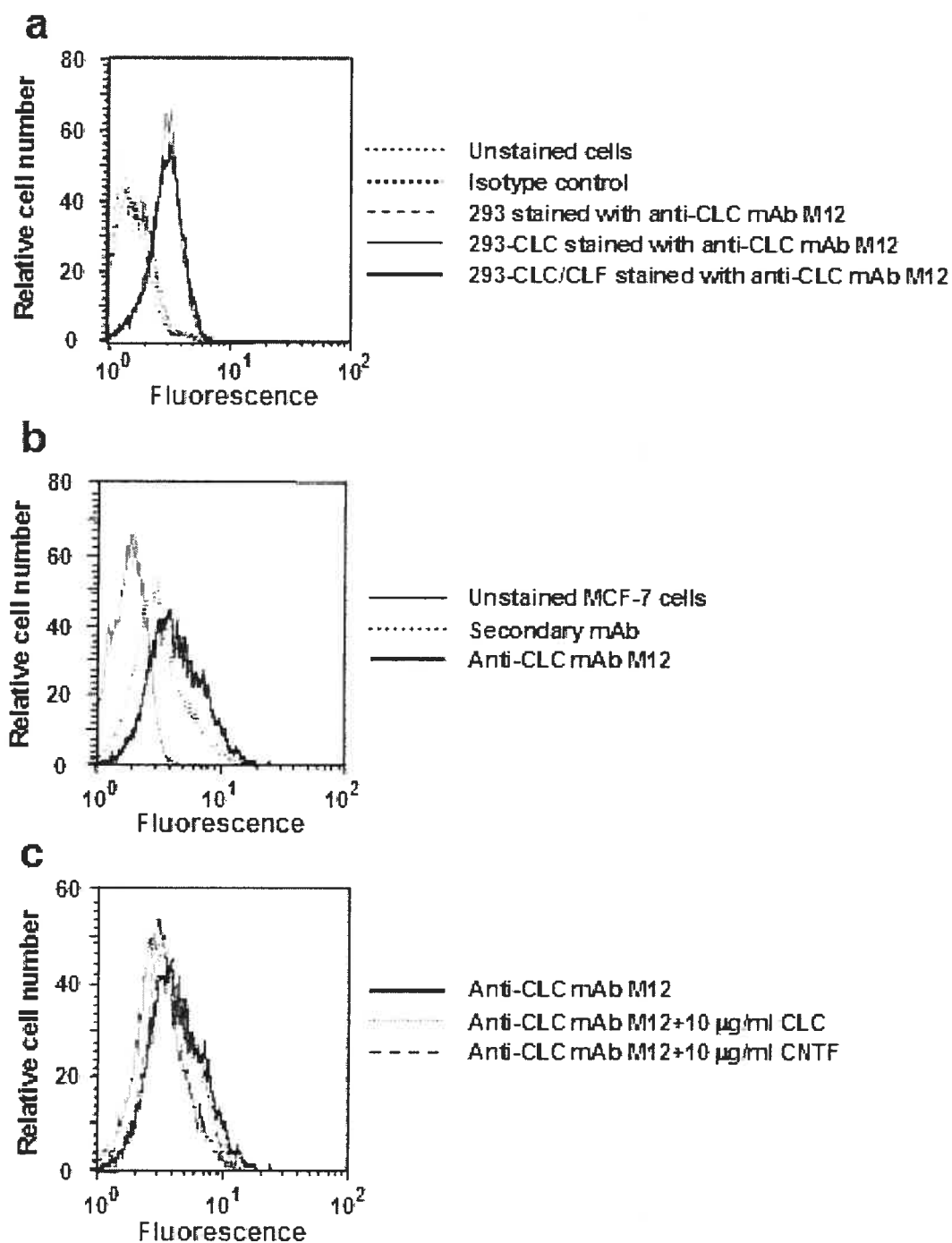


Figure 3

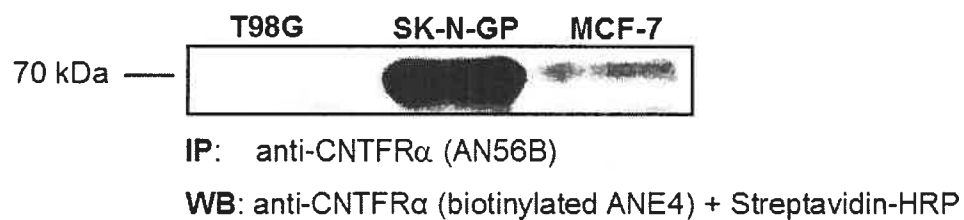


**Figure 4**

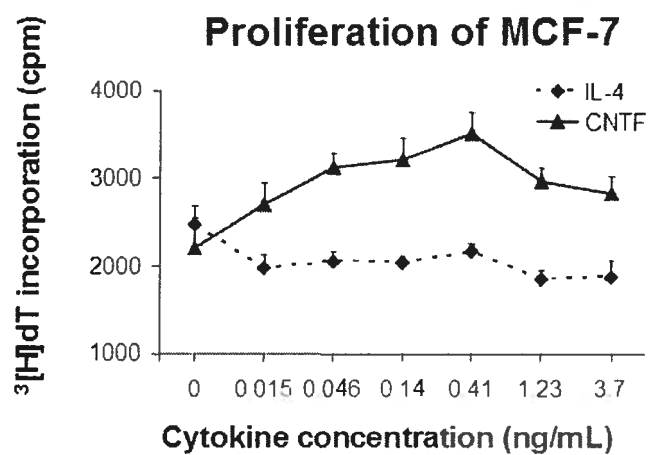


**Figure 5**

**a**

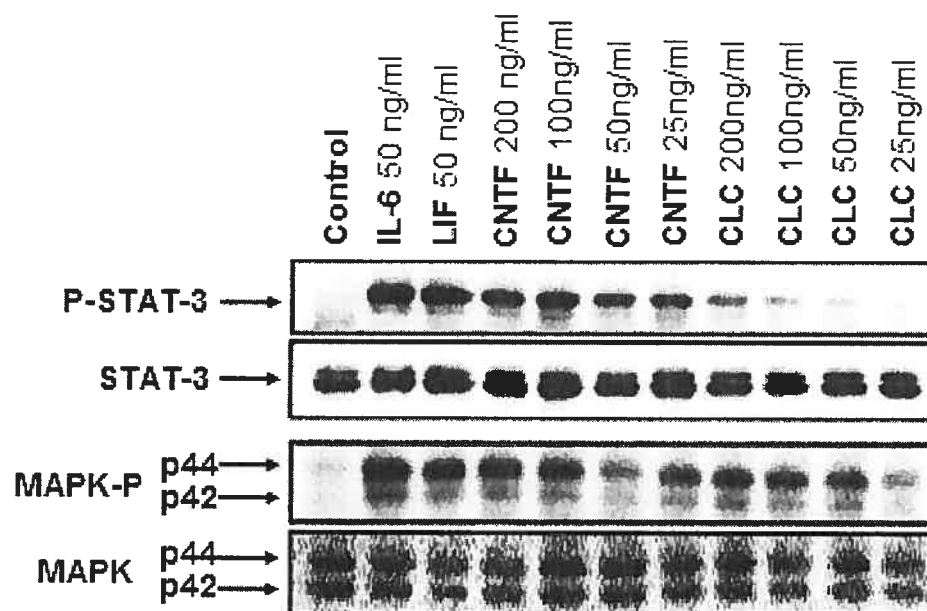


**b**

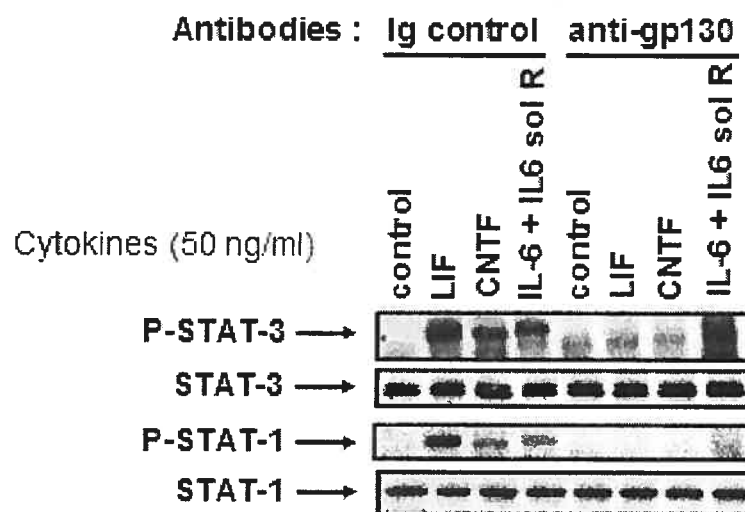


**Figure 6**

**a**



**b**



## REFERENCES

1. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-5.
2. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-21.
3. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002;109 Suppl:S121-31.
4. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303.
5. Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:2499-513.
6. Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000;19:6613-26.
7. Bravo J, Heath JK. Receptor recognition by gp130 cytokines. *Embo J* 2000;19:2399-411.
8. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
9. Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998;92:3495-504.
10. Murakami M, Kamimura D, Hirano T. New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors* 2004;22:75-7.
11. Douglas AM, Goss GA, Sutherland RL, Hilton DJ, Berndt MC, Nicola NA, Begley CG. Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene* 1997;14:661-9.
12. Knupfer H, Schmidt R, Stanitz D, Brauckhoff M, Schonfelder M, Preiss R. CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast* 2004;13:28-34.
13. Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991;253:59-63.
14. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 1993;260:1805-8.
15. Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D, Beckmann MP. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *Embo J* 1991;10:2839-48.
16. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley B, et al. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992;255:1434-7.
17. Douglas AM, Grant SL, Goss GA, Clouston DR, Sutherland RL, Begley CG. Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998;75:64-73.
18. Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, Lindholm D, Thoenen H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 1989;342:920-3.
19. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 2000;3:867-72.
20. Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 1990;10:3507-15.

21. Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 1994;265:1107-10.
22. Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 1992;358:502-4.
23. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990;345:440-1.
24. Curtis R, Adryan KM, Zhu Y, Harkness PJ, Lindsay RM, DiStefano PS. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature* 1993;365:253-5.
25. Helgren ME, Squinto SP, Davis HL, Parry DJ, Boulton TG, Heck CS, Zhu Y, Yancopoulos GD, Lindsay RM, DiStefano PS. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 1994;76:493-504.
26. Guillet C, Auguste P, Mayo W, Kreher P, Gascan H. Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci* 1999;19:1257-62.
27. Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4652-7.
28. Watt MJ, Dzamko N, Thomas WG, Rose-John S, Ernst M, Carling D, Kemp BE, Febbraio MA, Steinberg GR. CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 2006;12:541-8.
29. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 2005;310:679-83.
30. Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, deLapeyriere O, Lelievre E, Guillet C, Hermann J, Gauchat JF, Gascan H, Chevalier S. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J* 2001;20:1692-703.
31. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 1993;365:27-32.
32. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 1995;83:313-22.
33. Alexander WS, Rakar S, Robb L, Farley A, Willson TA, Zhang JG, Hartley L, Kikuchi Y, Kojima T, Nomura H, Hasegawa M, Maeda M, et al. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 1999;9:605-8.
34. Forger NG, Prevette D, deLapeyriere O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P, Oppenheim RW. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* 2003;23:8854-8.
35. Knappskog PM, Majewski J, Livneh A, Nilsen PT, Bringsli JS, Ott J, Boman H. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:375-83.
36. Rousseau F, Gauchat JF, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, Cognet I, Froger J, Hahn AF, Knappskog PM, Gascan H, Boman H. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10068-73.
37. Hahn AF, Jones DL, Knappskog PM, Boman H, McLeod JG. Cold-induced sweating syndrome: a report of two cases and demonstration of genetic heterogeneity. *J Neurol Sci* 2006;250:62-70.
38. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-86.

39. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
40. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL- 6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11458-63.
41. Cognet I, Guilhot F, Chevalier S, Guay-Giroux A, Bert A, Elson GC, Gascan H, Gauchat JF. Expression of biologically active mouse ciliary neutrophic factor (CNTF) and soluble CNTFRalpha in *Escherichia coli* and characterization of their functional specificities. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:255-62.
42. Kallen KJ, Grotzinger J, Lelievre E, Vollmer P, Aasland D, Renne C, Mullberg J, Myer zum Buschenfelde KH, Gascan H, Rose-John S. Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. *J Biol Chem* 1999;274:11859-67.
43. Anderson WA, Perotti ME, McManaway M, Lindsey S, Eckberg WR. Similarities and differences in the ultrastructure of two hormone-dependent and one independent human breast carcinoma grown in athymic nude mice: comparison with the rat DMBA-induced tumor and normal secretory mammaryocytes. *J Submicrosc Cytol* 1984;16:673-90.
44. Asgeirsson KS, Olafsdottir K, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM. The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 1998;10:720-8.
45. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-93.
46. Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:499-508.
47. Nagaraja GM, Othman M, Fox BP, Alsaber R, Pellegrino CM, Zeng Y, Khanna R, Tamburini P, Swaroop A, Kandpal RP. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene* 2006;25:2328-38.
48. Madsen MW, Briand P. Relationship between tumorigenicity, in vitro invasiveness, and plasminogen activator production of human breast cell lines. *Eur J Cancer* 1990;26:793-7.
49. Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW. Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 1991;2:365-72.
50. Maemura M, Akiyama SK, Woods VL, Jr., Dickson RB. Expression and ligand binding of alpha 2 beta 1 integrin on breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:223-35.
51. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 2000;74:265-72.
52. Chevalier S, Fourcin M, Robledo O, Wijdenes J, Pouplard-Barthelaix A, Gascan H. Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem* 1996;271:14764-72.
53. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 1993;259:1736-9.
54. Crichton MB, Nichols JE, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER. Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996;118:215-20.



55. Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, Rincon M. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:8851-8.
56. Benoy I, Salgado R, Colpaert C, Weytjens R, Vermeulen PB, Dirix LY. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2002;2:311-5.
57. Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, Huget P, Dirix LY. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 2003;103:642-6.
58. Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88:1721-6.
59. Bozcuk H, Uslu G, Samur M, Yildiz M, Ozben T, Ozdogan M, Artac M, Altunbas H, Akan I, Savas B. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cytokine* 2004;27:58-65.
60. Iacopetta B, Grieu F, Joseph D. The -174 G/C gene polymorphism in interleukin-6 is associated with an aggressive breast cancer phenotype. *Br J Cancer* 2004;90:419-22.
61. Hefler LA, Grimm C, Lantzsch T, Lampe D, Leodolter S, Koelbl H, Heinze G, Reinthaller A, Tong-Cacsire D, Tempfer C, Zeillinger R. Interleukin-1 and interleukin-6 gene polymorphisms and the risk of breast cancer in caucasian women. *Clin Cancer Res* 2005;11:5718-21.
62. DeMichele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Klein-Cabral M, Athanasiadis G, Colligan T, Stadtmauer E, Weber B. Interleukin-6 -174G-->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:8051-6.
63. Grant SL, Douglas AM, Goss GA, Begley CG. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors* 2001;19:153-62.
64. Kurebayashi J. Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications. *Breast Cancer* 2000;7:124-9.
65. Kraves S, Weitz CJ. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* 2006;9:212-9.
66. Keith LG, Oleszczuk JJ, Laguens M. Circadian rhythm chaos: a new breast cancer marker. *Int J Fertil Womens Med* 2001;46:238-47.
67. Mormont MC, Levi F. Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int J Cancer* 1997;70:241-7.
68. Mayer IA. Targeting cytokine receptors and pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Res* 2005;126:243-62.

## Chapitre 5. Génération de souris transgéniques

Dans un souci de compréhension, cette partie sera présentée de façon non conventionnelle. La technologie employée étant complexe, nous avons fait le choix de ne pas séparer la partie « matériel et méthodes » de la partie « résultats ».

### I. Généralités

Avec l'augmentation du nombre de gènes identifiés lors du décryptage du génome, il est devenu impératif que des méthodes efficaces pour analyser la fonction des gènes, soient développées. Leurs rôles sont bien souvent inconnus et une des approches pour les étudier consiste à perturber la fonction des gènes dans l'animal soit en inactivant le gène, soit en le mutant. De nombreuses méthodes ont été développées mais, dans tous les cas, la modification doit être effectuée au départ dans des cellules types pouvant donner naissance à des cellules germinales fonctionnelles, spermatozoïdes ou ovocytes. Les cellules les plus fréquemment utilisées à ce jour sont les cellules souches embryonnaires (embryonic stem cells/cellules souches embryonnaires/ES) pour leur capacité à produire des recombinaisons homologues à haute fréquence, la facilité de leur utilisation en culture *in vitro* et la possibilité de passer d'une culture *in vitro* au développement embryonnaire *in vivo* après incorporation dans un hôte (Joyner, 2001).

#### A. Knock-Out « conventionnel »

Les études de fonction *in vivo* d'un gène sont délicates. Le ciblage des gènes dans les cellules souches offre une approche puissante pour étudier la fonction des gènes dans les organismes mammifères. L'étude d'une protéine passe en général par la génération d'une souris Knock-In dans le but d'établir son profil d'expression. Il est devenu possible d'effectuer n'importe quelle mutation dans la lignée germinale de souris en utilisant la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires. Pendant 10 ans, la plupart des mutations étaient relativement simples à mettre en œuvre puisque il s'agissait de créer des

mutations nulles (Knock-Out) fournissant ainsi un aperçu de la fonction d'un gène. La recombinaison homologue est utilisée pour altérer spécifiquement un gène endogène. Quand elle est combinée à un site spécifique de recombinaison, un large éventail de mutations peut être produit. Les lignées de cellules souches embryonnaires sont remarquables : après avoir été établies à partir d'un blastocyste, elles peuvent être cultivées et manipulées relativement facilement *in vitro* et elles peuvent encore conserver leur totipotence quand elles sont réimplantées dans un nouvel embryon (Joyner, 2001).

La technique du Knock-Out permet de désorganiser un gène cible endogène dans la lignée germinale de souris par insertion d'un marqueur pouvant être sélectionné (Capecchi, 1989). La majorité des 1000 souris Knock-Out existantes ont été produites suivant ce modèle. Beaucoup de ces souches ont donné des informations intéressantes sur la fonction biologique des gènes étudiés (Mak, 1998). Mais ces souris Knock-Out « conventionnelles » sont en général homozygotes pour un allèle nul dans la lignée germinale, elles fournissent donc des modèles appropriés pour les maladies non héréditaires, et mènent dans 30% des cas à une létalité embryonnaire ou post natale précoce (Kühn and Schwenk, 2001). En dehors de cette application, ces souris Knock-Out ne représentent pas nécessairement la meilleure approche technique pour étudier les autres aspects de la fonction des gènes *in vivo*, en particulier chez la souris adulte. C'est pourquoi, des stratégies de Knock-Out conditionnels ont été développées (Rajewsky *et al*, 1996) pour permettre d'inactiver un gène cible dans un organe, un type cellulaire ou un stade de développement précis (Gu *et al*, 1994).

## **B. Stratégie Knock-In**

Une variante très intéressante des vecteurs de ciblage pour l'obtention de mutations nulles résulte de l'introduction, en phase avec la séquence codante du gène ciblé, d'un ADNc d'intérêt. Une fois la recombinaison homologue effectuée dans le gène cible choisi, l'allèle modifié exprime l'ADNc inséré en lieu et place du gène endogène. Le choix de l'ADNc dépend évidemment du but recherché. Il peut s'agir par exemple de la séquence codante d'un gène rapporteur comme la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase dont l'activité est aisément repérable, y compris à l'échelle cellulaire (Berger *et al*, 1994; Weiss *et al*, 1999). Ainsi l'expression de la  $\beta$ -

galactosidase mime-t-elle l'expression du gène ciblé, ce qui est très précieux pour la détermination de son profil d'expression, mais peut également être utile pour suivre le destin des cellules exprimant normalement le gène cible dans le contexte d'un animal porteur de la mutation à l'état homozygote. Une autre utilisation de la stratégie Knock-In particulièrement intéressante concerne le cas de gènes appartenant à une famille multigénique ayant un profil d'expression différent et dont l'inactivation respective entraîne des phénotypes contrastés. Le but d'une stratégie d'inactivation Knock-In est de placer un gène d'intérêt sous le contrôle transcriptionnel (du promoteur) du gène endogène. Les Knock-In permettent donc une étude simultanée de la fonction et de l'expression du gène d'intérêt.

### **C. Knock-Out ou Knock-In conditionnels**

Cependant, ces situations dans lesquelles les souris mutantes portent la mutation dans toutes leurs cellules, ont aussi leurs limites notamment pour deux types de raisons. Dans le cas où la mutation entraîne à l'état homozygote une létalité embryonnaire, il devient impossible d'étudier la fonction éventuelle du gène, au-delà du moment où les embryons meurent et donc pendant toute la vie adulte. Un gène peut avoir un profil d'expression très large et son invalidation entraîne un phénotype complexe qui affecte de multiples tissus. Il serait alors utile, pour simplifier l'analyse, de créer des souris porteuses de la mutation seulement dans l'un ou l'autre de ces tissus. C'est ainsi que les stratégies d'inactivation conditionnelle ont été développées. L'inactivation du gène cible dans un mutant conditionnel est obtenue grâce à l'expression d'une recombinaise reconnaissant un site spécifique sur l'ADN (Cre ou FLP) en conjonction avec l'introduction de deux séquences de recombinaison spécifique de la recombinaise (sites LoxP ou FRT) dans les régions non codantes du gène cible (Kühn and Schwenk, 2001). Ces sites sont habituellement placés dans la même orientation de sorte que la recombinaison conduise à la délétion de l'exon flanqué de ces séquences et donc à l'inactivation du gène (Kühn and Schwenk, 2001). La génération d'un allèle conditionnel pour un gène endogène a été décrite pour la première fois en 1994 pour le gène de l'ADN polymérase  $\beta$ , dans lequel une région de 1,5 kb contenant le promoteur et le premier exon avait été flanquée des sites LoxP (Gu *et al*, 1994). Les principaux objectifs dans la conception d'un vecteur

conditionnel basé sur le système Cre-LoxP, sont que l'expression du gène cible ne doit pas être perturbée par la présence des sites LoxP, mais doit être inactivée quand la Cre recombinase entre en jeu. Cette méthode requiert la génération de deux souches de souris transgéniques : une souche présentant un gène flanqué des sites LoxP ou FRT dans les cellules souches et une seconde souche de souris exprimant de façon constitutive ou de façon inductible la Cre ou la FLP recombinase dans un ou plusieurs organes (Kühn and Schwenk, 2001). Le mutant conditionnel sera généré en croisant ces deux souches de telle sorte que l'inactivation du gène cible se fera d'une manière spatio-temporelle, suivant le profil d'expression de la recombinase dans la souche transgénique. Comme l'allèle homozygote flanqué des séquences LoxP ou FRT doit être combiné avec un transgène hétérozygote codant pour la recombinase, il faut souvent une génération supplémentaire pour obtenir un nombre raisonnable de mutants conditionnels. La souche contenant les LoxP peut aussi être convertie en un mutant nul pour l'allèle donné par un simple croisement avec une souche délétère exprimant la Cre recombinase dans les cellules germinales ou dans l'embryon précoce (Kühn and Schwenk, 2001).

Les mutants conditionnels sont utilisés pour répondre à différents problèmes qui ne pouvaient pas être résolus avec les Knock-Out classiques, qui mènent souvent à la mort embryonnaire ou néonatale des souris. Il n'y a pas de règle pour décider s'il est plus judicieux de choisir un Knock-Out classique ou un Knock-Out conditionnel pour une expérimentation précise, tout dépend de la question biologique et des connaissances et du contexte sur le gène ciblé. En revanche, le choix d'un Knock-Out conditionnel laisse toutes les possibilités d'analyses puisqu'il offre une grande flexibilité par rapport à l'approche traditionnelle sans pour autant impliquer d'efforts supplémentaires. Si le principal objectif du projet concerne le rôle de différents types cellulaires dans un processus physiologique, l'utilisation d'une souche non inductible exprimant la Cre recombinase dans un type cellulaire spécifique est le choix le plus judicieux puisqu'une collection de souches tissus spécifiques est déjà disponible. Dans le choix de la souche transgénique exprimant la Cre recombinase pour une expérimentation particulière, il est important d'avoir connaissance du stade de développement dans lequel la lignée choisie commence à inactiver la cible, car beaucoup de

régions promotrices utilisées pour l'expression de la Cre sont actives avant la naissance (Kühn and Schwenk, 2001).

Le ciblage inductible d'un gène permet spécialement d'analyser la fonction du gène chez l'adulte, puisqu'il mène à l'inactivation du gène chez les animaux qui peuvent ainsi avoir un développement embryonnaire normal. De plus, il permet également une investigation des effets de l'inactivation après le déclenchement d'une maladie chronique ou aiguë. Cet aspect présente un intérêt important dans la validation de gènes pour le développement de drogues pharmaceutiques, puisque le gène peut être inactivé dans un contexte de maladie complètement développée. L'inactivation conditionnelle pourra fournir des informations sur la fonction biologique de la protéine étudiée dans les tissus adultes.

Un des avantages d'un Knock-In conditionnel est que, comme l'induction de la modification se fait à un stade de développement donné, le produit du gène sauvage a déjà été produit et l'organisme n'a pas l'opportunité de s'adapter à l'altération génétique. Les réponses compensatoires qui peuvent fausser l'interprétation des mutations sont éliminées, fournissant ainsi une relation plus précise entre le génotype et le phénotype (Joyner, 2001).

#### **D. Les systèmes de recombinaison**

La Cre recombinase est une enzyme issue du phage P1 qui reconnaît et entraîne la recombinaison entre deux séquences de 34 pb appelées sites LoxP (Kilby *et al*, 1993). Comme la Cre recombinase ne requiert aucun cofacteur ou protéines accessoires pour activer la recombinaison et a une activité optimale à 37°C, le système Cre/LoxP est largement utilisé comme système de recombinaison pour le génie génétique dans les cellules souches embryonnaires et les souris (Kilby *et al*, 1993). Un site LoxP est composé de deux répétitions inversées de 13 pb séparés par une séquence asymétrique de 8 pb qui détermine l'orientation du site LoxP (Hoess *et al*, 1982; Abremski *et al*, 1983). La recombinaison produite par la Cre recombinase entre deux sites LoxP résulte en un échange réciproque des brins d'ADN entre ces sites (Abremski *et al*, 1983). Selon l'orientation et la localisation des deux séquences, différents produits sont générés. Quand deux sites LoxP sont placés dans la même orientation sur une molécule d'ADN linéaire, la recombinaison résulte en une excision du fragment

d'ADN flanqué des séquences LoxP laissant un seul de ces sites sur les deux produits générés. Quand les deux sites LoxP sont placés sur la même molécule avec une orientation opposée, la recombinaison permet une inversion de la séquence flanquée des sites LoxP (Abremski *et al*, 1983). La relation exacte entre le nombre de molécules Cre dans une cellule et l'efficacité de délétion d'un fragment flanqué des sites LoxP n'a pas été établie. L'étendue de la recombinaison avec la Cre peut être amenée à diminuer quand la distance entre deux sites LoxP augmente, et il semble également qu'elle dépende de la position chromosomique du gène cible (Baubonis and Sauer, 1993).

Bien qu'il existe d'autres systèmes de recombinaison à des sites spécifiques, peu d'efforts ont été faits pour les utiliser dans des cellules de mammifères. Leur valeur pratique reste peu claire, et leur efficacité n'a pas été complètement comparée avec le système Cre/LoxP (Kolot *et al*, 1999; Groth *et al*, 2000; Schwikardi and Droge, 2000). Seule la recombinase FLP, qui dérive de la levure, est fréquemment employée. Sa température optimale est de 30°C et elle est très instable à 37°C (Buchholz *et al*, 1998). L'affinité de la FLP pour son site FRT est plus faible que celle de la Cre pour les sites LoxP (Ringrose *et al*, 1998). Un mutant de la FLP a été généré, la FLPe, dont la thermo stabilité et l'activité à 37°C est améliorée (Buchholz *et al*, 1998).

Pour générer un Knock-Out ou un Knock-In conditionnel, la stratégie que nous avons choisie est de combiner la recombinaison Cre/loxP pour l'inactivation conditionnelle du gène cible et le système FLP/FRT pour enlever le gène de sélection du génome des cellules souches embryonnaires (Meyers *et al*, 1998). Les deux étapes de recombinaison peuvent se faire soit dans les cellules souches par une expression transitoire de la recombinase, soit *in vivo* en utilisant des souches de souris Cre ou FLP délétères.

### **E. Différentes étapes pour générer une souris transgénique**

La méthode la plus courante pour générer une souris Knock-Out ou Knock-In consiste à cloner un marqueur de sélection dans la séquence codante du gène étudié (Joyner, 2001). La première étape est de construire un vecteur cible comportant toutes les fonctionnalités nécessaires à la stratégie adoptée (Tableau 1). Avant toute insertion dans le génome, l'intégrité du vecteur doit être

vérifiée avec précision de façon à ne pas introduire de mutations non désirées dans le gène endogène. Le vecteur est ensuite linéarisé à l'aide d'enzymes de restriction, et il est introduit par électroporation dans les cellules souches embryonnaires où aura lieu l'évènement de recombinaison homologue (Joyner, 2001)(Tableau 1). Le vecteur cible est introduit dans les cellules souches embryonnaires par recombinaison homologue entre les bras d'homologie et sera transmis à travers la lignée germinale des souris chimériques (Joyner, 2001). Les recombinaisons homologues sont rares. La sélection des clones de cellules souches embryonnaires recombinants se fait grâce au gène de résistance introduit dans la cassette de recombinaison en cultivant ces cellules avec l'antibiotique associé (dans notre cas, résistance à la néomycine, sélection avec la généticine)(Tableau 1). Après sélection, la vérification de l'insertion correcte de la cassette de recombinaison se fait par PCR, Southern Blot. Les clones positifs sont également vérifiés par un caryotypage pour augmenter la probabilité d'un passage du Knock-In dans la lignée germinale. L'élimination du gène de sélection peut être réalisée *in vitro* par électroporation dans les clones de cellules souches embryonnaires sélectionnés d'un plasmide codant pour la recombinase FLP. Une vérification supplémentaire de l'intégrité du génome devra être réalisée comme précédemment par PCR, Southern Blot et caryotypage. Les clones positifs ainsi sélectionnés sont ensuite injectés dans les blastocystes qui sont réimplantés dans des souris pseudo gestantes (Joyner, 2001). La génération de souris issue de cette injection permet l'obtention de chimères (Joyner, 2001). Ces souris chimériques sont alors croisées avec des souris sauvages de même fond génétique que le blastocyste pour obtenir une transmission germinale et ainsi obtenir une souris hétérozygote pour le transgène (Tableau 1). La probabilité d'obtenir des souris hétérozygotes dépend du taux de colonisation des gamètes par les cellules souches embryonnaires (Joyner, 2001). La dernière étape consiste à croiser les souris hétérozygotes avec des souris Cre spécifiques pour obtenir une souris nulle dans un tissu spécifique ou dans tout l'organisme. L'analyse du phénotype peut alors commencer (Tableau 1).



	ÉTAPES	Nb de semaines
1	Clonage et caractérisation du gène d'intérêt	variable
2	Construction du vecteur cible	16
3	Vérification de l'intégrité du vecteur	6
4	Transfection des cellules ES et recombinaison homologue	12
5	Transfection des cellules ES pour éliminer le gène de résistance	8
6	Injection de clones dans les blastocystes et obtention des chimères	12
7	Obtention de la transmission germinale	6 à 20
8	Élevage des souris hétérozygotes et homozygotes	22
9	Analyse du phénotype	Illimité

**Tableau 1 : Principales étapes pour générer une souris transgénique**

## II. CHOIX DES CIBLES

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'inactivation du gène codant pour le CNTFR $\alpha$  chez la souris conduit à un phénotype très sévère conduisant à la mort périnatale des animaux (DeChiara *et al*, 1995). L'analyse du phénotype de souris inactivées pour le gène du CNTF démontre que ces animaux sont viables et ne présentent qu'une dégénérescence de certaines populations de motoneurones, ce qui entraîne une légère diminution de leurs forces musculaires (Masu *et al*, 1993; Guillet *et al*, 1999). De plus, une mutation homozygote inactivant le gène du CNTF a été identifiée dans 2,3 % de la population humaine sans troubles neurologiques particuliers (Takahashi *et al*, 1994). La grande différence entre le phénotype silencieux des souris CNTF<sup>-/-</sup> et la gravité de celui des souris CNTFR<sup>-/-</sup> (DeChiara *et al*, 1995) suggère que les autres ligands du récepteur au CNTF, qui sont le complexe CLC/CLF et la neuropoïétine, jouent un rôle important dans le

développement. L'importance de la fonction du complexe CLC/CLF est également indiquée par le phénotype des patients CISS (Knappskog *et al*, 2003; Rousseau *et al*, 2006). A ce jour, il n'existe pas de modèles de souris dans lesquels les gènes de CLC ou de la neuropoïétine ont été inactivés. De plus, peu de données concernant ces deux protéines sont disponibles et il est donc nécessaire de produire ces souris pour pouvoir analyser leur profil d'expression et leur fonction. Dans ce but, nous avons décidé de générer deux souris transgéniques dans lesquelles nous inactiverons le gène de CLC de façon conditionnelle, et le gène de la neuropoïétine.

La génération d'une souris Knock-In pour le gène de CLC nous permettra d'étudier l'expression et la fonction de CLC dans le développement, en particulier, dans le développement des systèmes nerveux et immunitaire. Un autre objectif sera également d'utiliser les souris CLC<sup>-/-</sup> pour étudier le rôle de CLC dans l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle murin de la sclérose en plaques (Swanborg, 1995). Sur la base des données obtenues pour le CNTF (Linker *et al*, 2002), nous supposons un rôle protecteur de CLC dans l'EAE et nous étudierons une possible exacerbation des symptômes.

### **III. Inactivation de CLC : Modèle de Souris Knock-In conditionnel**

#### **A. Le choix du Knock-In conditionnel**

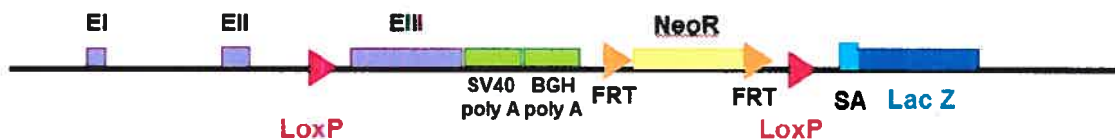
Les phénotypes des souris inactivées pour le gène du CNTFR $\alpha$  (DeChiara *et al*, 1995) ou pour le gène de CLF (Alexander *et al*, 1999a) mènent à la mort périnatale des animaux ; nous avons donc émis l'hypothèse que l'inactivation du gène pour CLC pouvait être également létale. Pour les souris CLF<sup>-/-</sup>, les souris meurent à cause de leur incapacité à se nourrir, c'est-à-dire que les petits ne peuvent pas téter (Alexander *et al*, 1999a). Pour les souris CNTFR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, ce phénomène n'a pas été étudié. De plus, l'analyse des patients atteints du syndrome CISS a montré que certains présentaient une mutation homozygote inactivant le CLF (Knappskog *et al*, 2003) et d'autres des mutations menant à l'inactivation des deux allèles de CLC (Rousseau *et al*, 2006). Ces patients sont survivants mais ne présentent aucun intérêt pour la nourriture. A la naissance, ils

ne se nourrissent pas spontanément et ont dû être nourris « de force » lors de leur enfance.

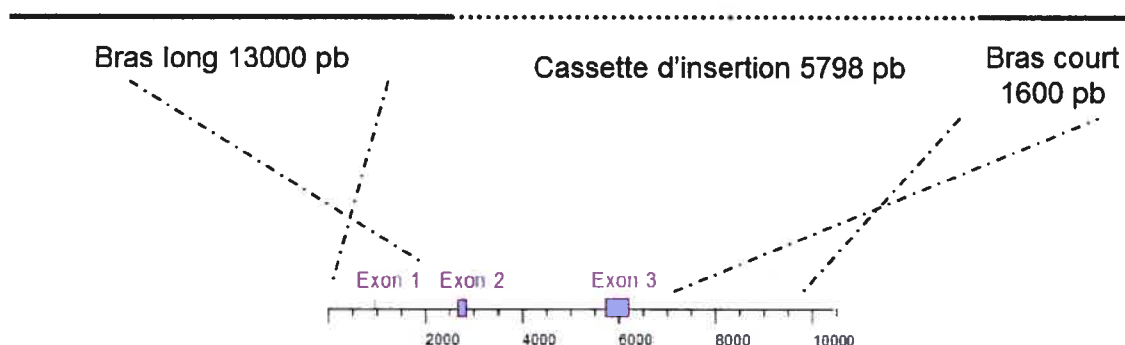
C'est pourquoi, nous avons décidé de générer une souris Knock-In inducible ou conditionnel pour étudier le phénotype de ces souris. Ceci nous permettra d'étudier le profil d'expression et la fonction de CLC.

## **B. Stratégie et description du vecteur cible**

L'objectif est de créer un Knock-In en introduisant un gène rapporteur, le gène de la  $\beta$ -galactosidase, qui sera exprimé sous le contrôle du promoteur de CLC et ce, uniquement dans les cellules où l'inactivation de CLC aura été induite par la recombinaison Cre. Le gène de CLC est composé de trois exons. Le troisième exon code pour la majeure partie de la protéine. Le but est donc d'inactiver cet exon de façon conditionnelle en plaçant de part et d'autre de la région des sites LoxP (Figure 10). Le gène de CLC a été cloné après avoir criblé une banque de cosmides murins issue du « Resource Centre of the German Human Genome Project (RZPD; <http://www.rzpd.de>). Un fragment de restriction *Bam*HI-*Eco*RI de 15 kb du cosmide identifié a été utilisé pour générer le vecteur cible servant à la recombinaison homologue. Le fragment a été inséré dans un vecteur pET à faible copie. Dans ce vecteur, les sites LoxP ont été insérés dans les sites de restrictions *Hpa*I et *Sca*I localisés en 3' et en 5' de l'exon III (Figure 11A). Le second site LoxP est placé dans le grand bras d'homologie de telle sorte que les deux sites soient de part et d'autre de l'exon III du gène *clc*. Pour positionner les sites LoxP à l'intérieur du gène cible, il est recommandé de les placer à environ 200 pb ou plus de la limite des exons pour réduire le risque d'interférence avec les signaux d'épissage (Kühn and Schwenk, 2001).



### Recombinaison homologue



**Figure 10 : Stratégie de construction du Knock-In conditionnel de CLC.** L'expression sera suivie grâce au gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*) avec un site accepteur d'épissage (SA) en 5' de *LacZ*. Un double site de polyadénylation (SV40 poly A et BGH poly A) a été inséré en 5' du gène *LacZ* pour empêcher l'expression du gène rapporteur avant la délétion de l'exon III (EIII) par la Cre recombinase. Le gène de résistance (*NeoR*) utilisé pour la sélection des cellules souches embryonnaires est flanqué des sites FRT. Un plasmide codant pour la FLP recombinase (pOG44, Invitrogen) sera utilisé pour exciser le gène de la néomycine dans les cellules souches embryonnaires.

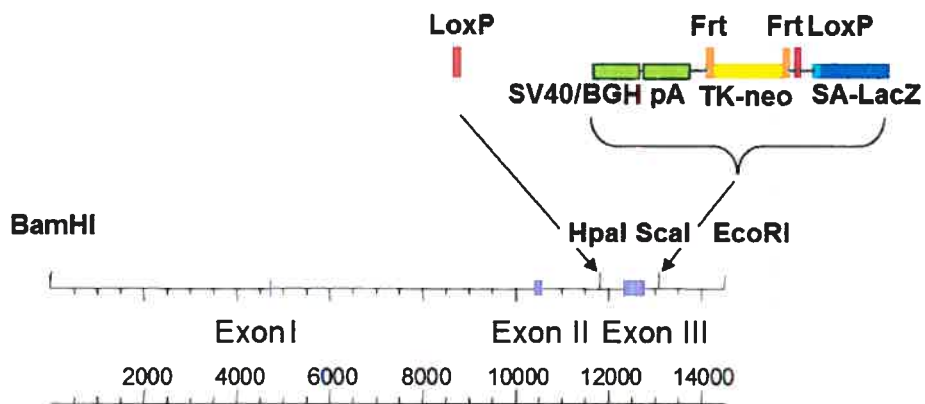
Le vecteur cible permettra l'insertion de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur du gène de CLC dans le génome de la souris. En effet, il est construit de telle sorte que la région codante de la  $\beta$ -galactosidase privée de son ATG initiateur forme un exon qui sera épissé dans le bon cadre de lecture avec les exons I et II du gène de CLC qui codent pour le codon initiateur ATG du gène cible et pour son peptide signal (Figures 10 et 11). Le gène rapporteur est flanqué des deux régions d'homologie d'une taille variant de 1,6 à 13 kb du gène cible. Le petit bras d'homologie de 1,6 kb est nécessaire pour le criblage par PCR des cellules souches embryonnaires. Le gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase est placé en amont de l'exon III et est précédé par un site 5' accepteur d'épissage (SA). L'insertion de deux sites de polyadénylation (Simian virus 40 (SV40 poly A) et Bovine Growth Hormone (BGH poly A)) en 3' de l'exon III

de CLC permet d'empêcher l'expression du gène rapporteur *LacZ* en absence de délétion de l'exon III de CLC (Figure 10).

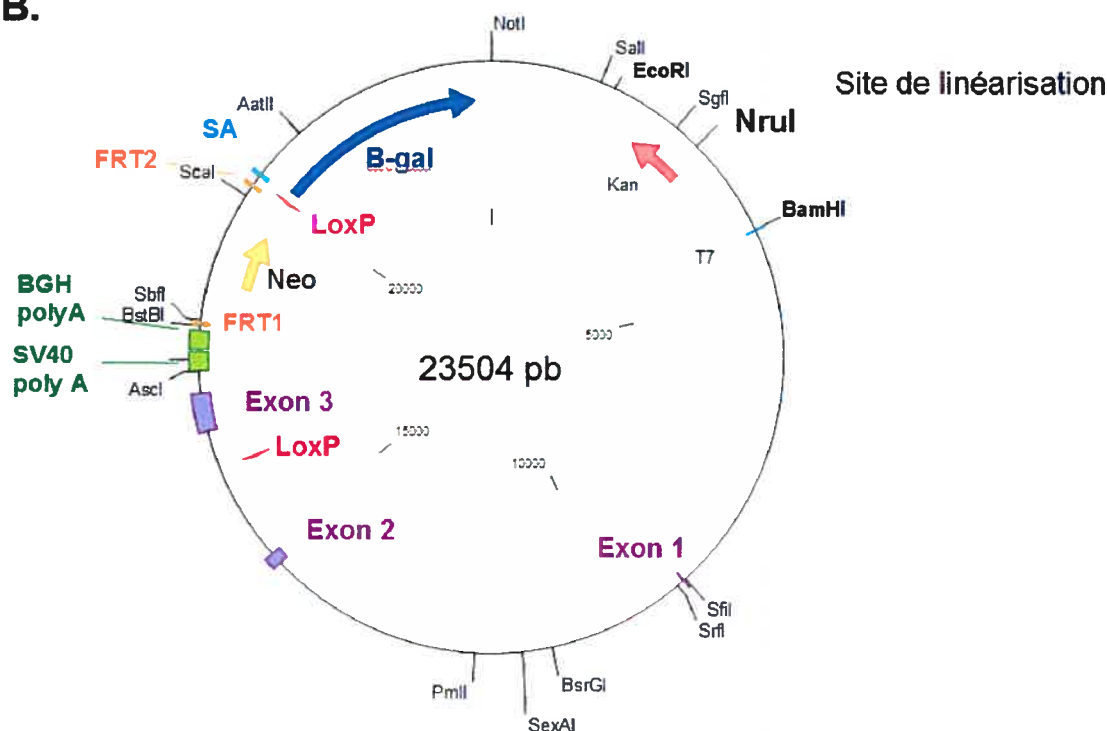
Le vecteur cible utilisé contient un gène de sélection, le gène de la résistance à la néomycine (*Neo*) (Figures 10 et 11). Par rapport à une construction conventionnelle de ciblage de gène, le gène de résistance ne détruit pas ou ne remplace pas un des exons mais est placé à l'intérieur d'un intron et flanqué par deux sites FRT, proche d'un site LoxP seul. Le gène de résistance (*Tk-neo*) utilisé pour la sélection dans les cellules souches embryonnaires est flanqué des deux sites de recombinaison de la FLP (FRT), et ainsi le gène pourra être délété avant l'injection dans les blastocystes. Le gène de sélection des cellules souches est inclus à l'intérieur du vecteur cible pour l'identification des clones ES recombinants, mais il doit être enlevé du génome de façon à minimiser la perturbation du gène cible.

Des constructions validées expérimentalement codant pour le gène *Tk-neo* flanqué des deux sites FRT (pBS-FREO-III) et pour le gène rapporteur *LacZ* avec le site de polyadénylation (pA) de l'hormone de croissance bovine (BGH) flanqué en 5' par un site LoxP (pLOX-SA- $\beta$ Gal-pA) nous ont été gracieusement mis à disposition par le Dr N Grillet (ENS, Paris, France).

A.



B.



**Figure 11 : Un fragment de 15kb correspondant au gène de CLC a été modifié en floxant l'exon 3 de ce gène. A. Stratégie de construction B. Carte du vecteur cible utilisé pour la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires. La construction a été insérée dans les sites de restriction *HpaI* et *Scal* situés de part et d'autre de l'exon III. L'exon III de CLC est flanqué par les sites *LoxP*. Deux sites de polyadénylation sont insérés en 3' de l'exon III de façon à empêcher l'expression du gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Le gène de résistance codant pour la néomycine (*Neo*) flanqué des sites *FRT* permet de sélectionner les clones ES ayant intégré la construction. Le site *NruI* correspond au site de restriction servant à la linéarisation du vecteur cible.**

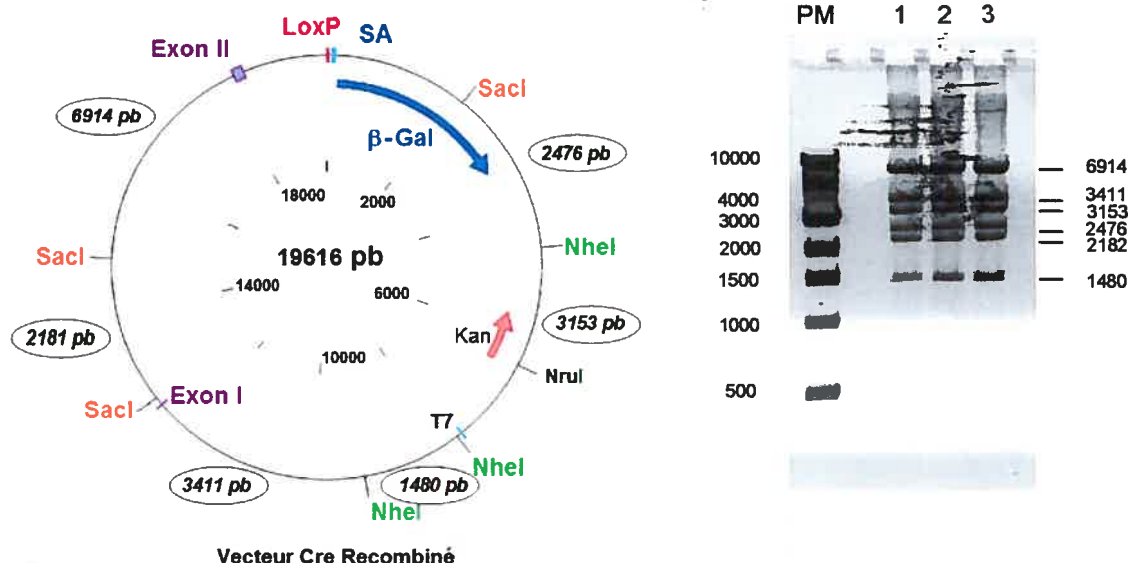
### **C. Vérifications de l'intégrité du vecteur**

Le vecteur cible est introduit dans les cellules souches embryonnaires par recombinaison homologue entre les bras d'homologie et transmis à travers la lignée germinale des souris chimériques. L'intégrité du vecteur doit donc être correcte pour éviter le transfert de mutations non désirées dans le gène cible.

Le vecteur cible a été séquencé avant la transfection dans les cellules souches embryonnaires. De nombreuses digestions enzymatiques ont été réalisées nous permettant de vérifier le profil de restriction théorique.

L'expression du gène de résistance à la néomycine dans les lignées cellulaires issues de la recombinaison homologue peut induire des phénotypes aspécifiques qui n'ont aucun lien avec l'inactivation du gène étudié. Afin d'éviter ce genre d'artéfact, le gène de résistance a été flanqué de sites FRT permettant son excision par recombinaison. Ainsi, le fonctionnement des sites FRT dans le vecteur cible a été étudié. Le vecteur cible a été transfecté dans des bactéries 294-FLP exprimant de façon constitutive la recombinase FLP (Buchholz *et al*, 1996). Le plasmide obtenu après recombinaison a été analysé par restriction enzymatique. Le système FLP/FRT a fonctionné correctement.

Enfin, l'inactivation du gène de CLC repose sur le bon fonctionnement des sites LoxP. Le fonctionnement des sites LoxP a été étudié *in vitro*. Le vecteur cible a d'abord été mis en présence de la recombinase Cre pendant 30 minutes et les produits issus de cette recombinaison ont été transformés dans des bactéries avant d'être analysés par PCR, par restriction enzymatique (Figure 12) et par séquençage.



**Figure 12 : Fonctionnement des sites LoxP du vecteur cible de CLC.** Après recombinaison avec la Cre recombinase, les produits générés ont été transformés dans des bactéries. Les vecteurs issus de cette recombinaison ont été analysés par restriction enzymatique avec les enzymes *NheI* et *SacI*. Six bandes correspondant à une recombinaison correcte sont attendues. Les tailles en pb sont indiquées sur la figure.

De plus, comme pour les sites FRT, le vecteur cible a également été transfecté dans des bactéries 294-Cre exprimant de façon constitutive la recombinase Cre (Buchholz *et al*, 1996). Le plasmide obtenu après recombinaison a été analysé par restriction enzymatique. Le système Cre/LoxP fonctionne correctement.

La vérification du vecteur étant correcte, il a pu être introduit par électroporation dans les cellules souches embryonnaires.

## **D. Génération des cellules souches embryonnaires recombinantes**

### **1. Caractéristiques des cellules souches embryonnaires**

Les cellules souches communément utilisées dérivent d'embryons mâles et contiennent ainsi un chromosome Y. Il y a plusieurs raisons pour préférer l'utilisation de lignées cellulaires mâles : les cellules mâles produisent une plus



grande proportion de chimères mâles qui peuvent produire une plus grande descendance que les femelles dans une période de temps donnée pour tester la transmission germinale (Joyner, 2001). De plus, les femelles issues de lignées cellulaires XX sont réputées instables. Cette instabilité a été montrée grâce à des travaux réalisés sur des lignées de carcinomes embryonnaires femelles qui démontrent une perte d'un chromosome X après plusieurs passages pour devenir XO (Joyner, 2001).

Les cellules souches embryonnaires employées pour la recombinaison homologue sont les cellules CK35 (Kress *et al*, 1998). Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'embryons de souris mâles 129/Sv de 3,5 jours. Cette lignée provient de l'Institut Pasteur de Paris et la lignée a été établie par C. Kress et C. Badinet. Les souris 129 ont un pelage de couleur agouti, donc les souris chimères issues de l'injection de cellules CK35 dans un blastocyste présenteront un chimérisme agouti avec la couleur des blastocystes utilisés. Ces cellules sont cultivées en présence de LIF qui permet de maintenir leur totipotence, et sur un support nutritif constitué d'un tapis de fibroblastes traités à la mitomycine.

## **2. Transfection des cellules souches embryonnaires CK35**

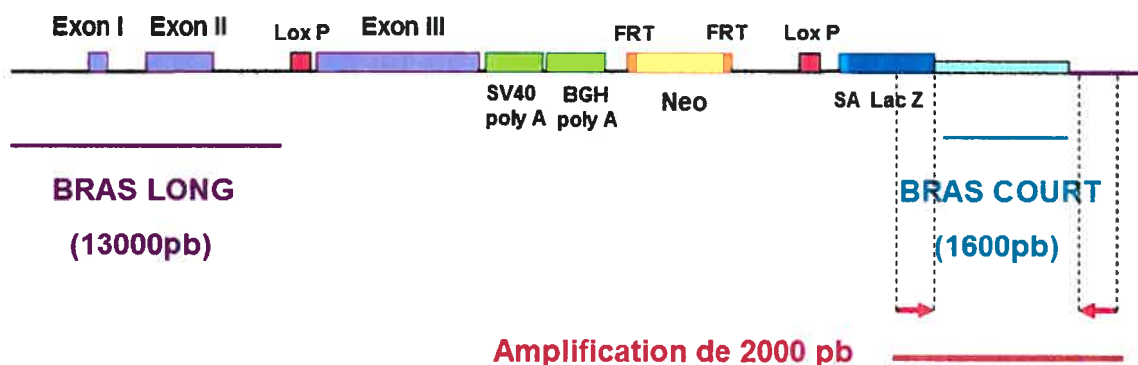
L'électroporation du vecteur cible dans les cellules souches embryonnaires a pour objectif d'aboutir à la recombinaison homologue entre les bras d'homologie du vecteur cible et la séquence sauvage du gène endogène des cellules souches embryonnaires.

La transfection du vecteur cible a été réalisée par électroporation à partir de  $50 \cdot 10^6$  cellules souches embryonnaires CK35 (13ème passage) avec 30  $\mu$ g d'ADN linéarisé avec l'enzyme de restriction *NruI* (Figure 11). Après électroporation, les cellules ont été mises en culture pendant 48h, puis sélectionnées avec 300  $\mu$ g/mL de généticine pendant 5-6 jours. 960 clones cellulaires résistants ont été sélectionnés puis repiqués en plaque 96 puits pour être congelés et analysés.

### 3. Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes

#### a. Criblage par PCR

Le criblage par PCR est un criblage de première intention permettant de réduire le nombre de clones recombinants qui seront ensuite testés par Southern Blot. Le criblage par PCR consiste à amplifier un fragment de 2000 pb à l'aide de deux oligonucléotides : le premier est localisé dans le gène rapporteur *LacZ* (5' ATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAAC 3'), permettant ainsi de ne discriminer que les clones ayant intégré la construction; la seconde amorce (5' CCAACTGAGTGGCACTACCACCATT 3') est localisée dans le génome sauvage en 3' du bras d'homologie utilisé pour la recombinaison homologue (Figure 13).

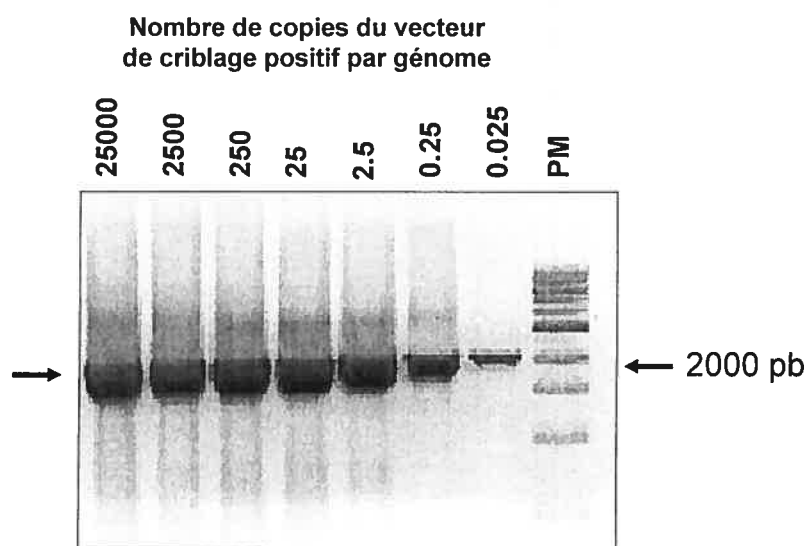


**Figure 13 : Criblage par PCR.** Les oligonucléotides sont situés dans le gène rapporteur *LacZ* (5' ATCAGCCGCTACA-GTCAACAGCAAC 3') et dans le génome sauvage (en marron) en dehors du bras d'homologie (5' CCAACTGAGTGGCACTACCACCATT 3'). L'amplification donnera un fragment de 2000 pbs.

Pour cela, nous avons synthétisé un vecteur de criblage positif de façon à mettre au point la PCR. Ce vecteur contient une partie de la cassette de recombinaison contenant entre autre le gène rapporteur suivi du bras court d'homologie et la séquence sauvage de *CLC* en amont du bras d'homologie. Ce vecteur de criblage positif a été dilué dans de l'ADN génomique de souris de façon à connaître le nombre exact de copies du vecteur par rapport au génome. La mise au point de la PCR a été réalisée et nous permet de discriminer jusqu'à 0,025

copies de vecteur par génome (Figure 14). Dans le criblage des cellules souches embryonnaires, nous aurons une copie par génome correspondant à l'intégration de la cassette de recombinaison au niveau d'un des deux allèles. La fréquence de recombinaison étant de 0,1 à 1%, la probabilité d'obtenir une double insertion au bon site de recombinaison sur les deux allèles est presque nulle.

Sur 500 clones testés par PCR, seuls douze clones se sont avérés positifs.

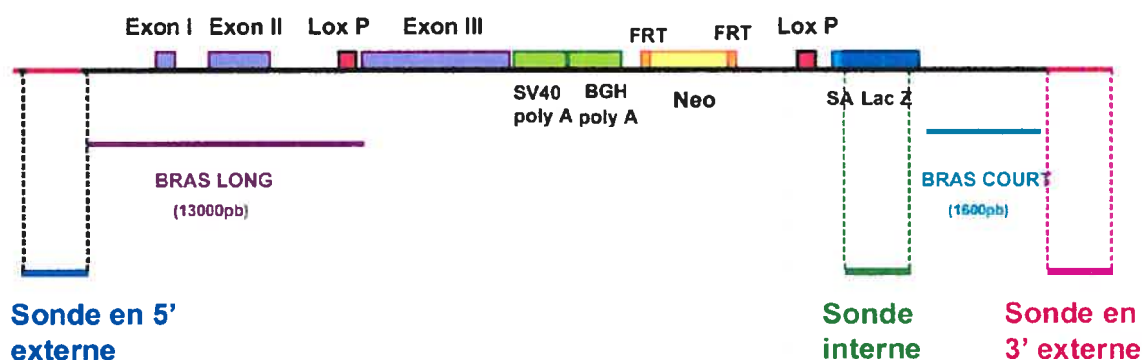


**Figure 14 : Mise au point des conditions de PCR pour le criblage des cellules souches embryonnaires.** Le vecteur de criblage positif a été dilué dans de l'ADN génomique de souris.

### ***b. Criblage par Southern Blot***

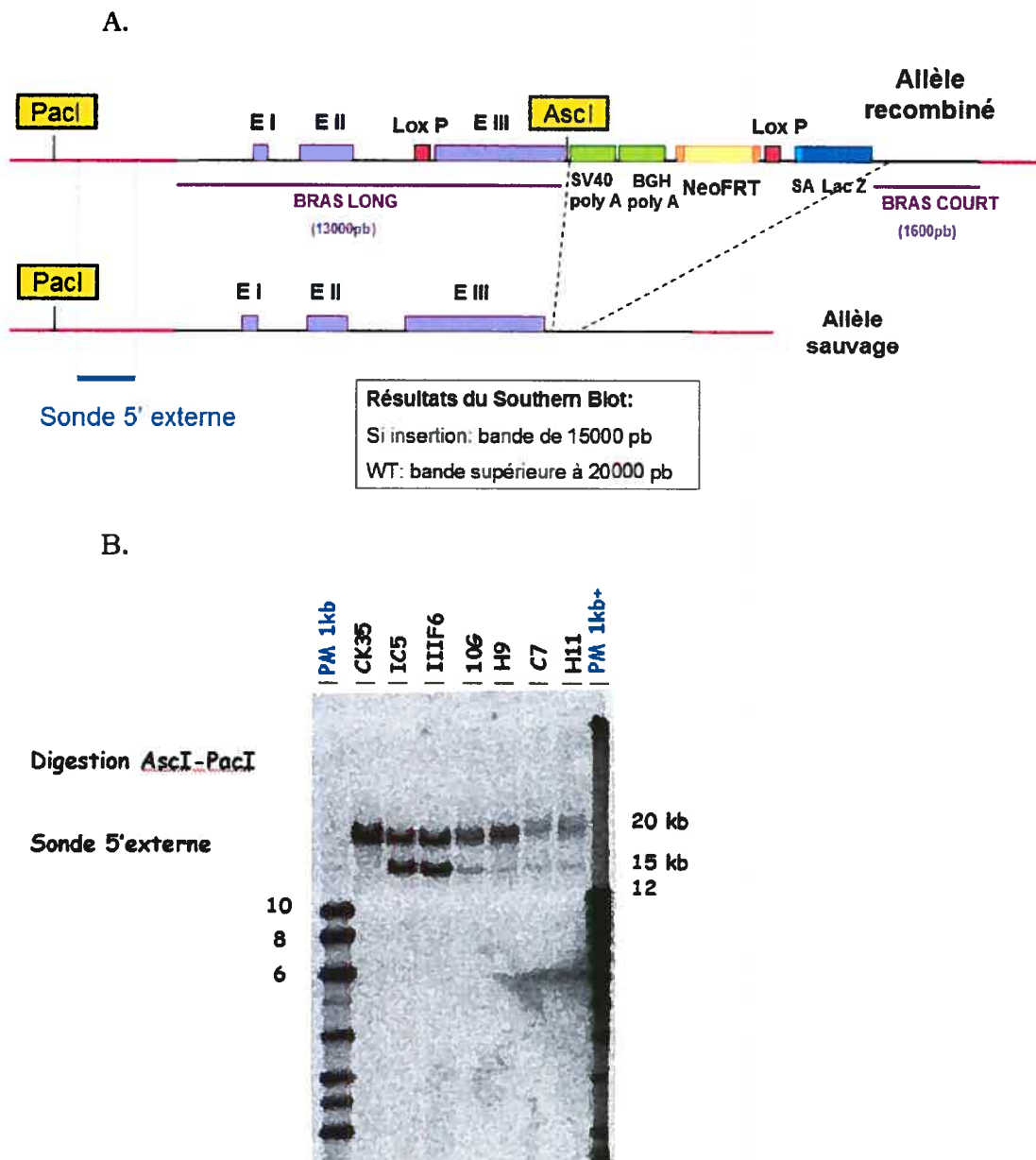
Dans les expériences de recombinaison homologue, il est important de vérifier que l'intégration de la cassette de recombinaison s'est faite au bon locus, de façon unique et sans réarrangement chromosomique aberrant (Joyner, 2001; Kühn and Schwenk, 2001). Cette vérification est réalisée par Southern Blot après digestion de l'ADN génomique avec des enzymes de restriction données et à l'aide de sondes spécifiques.

Trois types de sondes sont utilisées pour vérifier l'insertion correcte et l'intégrité de la construction : une sonde 5' externe permettant de vérifier l'intégrité de l'extrémité 5', une sonde 3' externe permettant de vérifier l'intégrité de l'extrémité 3' et une sonde interne permettant de vérifier l'insertion unique de la construction dans le génome (Figure 15).



**Figure 15 : Sondes utilisées pour le criblage des clones recombinants par Southern Blot.** Trois sondes sont utilisées pour le criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes : une sonde interne, une sonde 3' externe et une sonde 5' externe. Le résultat des trois types de Southern Blot permettra de discriminer les clones positifs.

A partir d'ADN génomique des cellules CK35, la sonde 5' externe de 878 pb a été générée par amplification par PCR grâce aux oligonucléotides 5' TAGGAACCA-CTAGCTGCTAC 3' et 5' CATTCCCTAGATGGCTTCAG 3'. Après digestion de l'ADN génomique des cellules sauvages (CK35) et des clones recombinants par les enzymes *PacI* et *Ascl* et hybridation avec la sonde 5' externe, la discrimination des clones positifs se fait par la présence d'une bande de 15 kb correspondant à une insertion correcte de la cassette de recombinaison sur un allèle, et une bande de 20 kb environ correspondant à l'allèle sauvage (Figure 16). Sur la piste correspondant aux cellules CK35 sauvages, une seule bande à 20kb est visible, alors que les clones IC5 et IIIF6 présentent deux bandes à 15 kb et 20 kb correspondant aux deux allèles sauvage et recombinant. L'intensité de la bande unique présente chez les cellules sauvages correspond à la présence de deux allèles. Pour les clones recombinants, l'intensité de la bande à 20kb est deux fois plus faible, puisqu'un seul des deux allèles est sauvage.

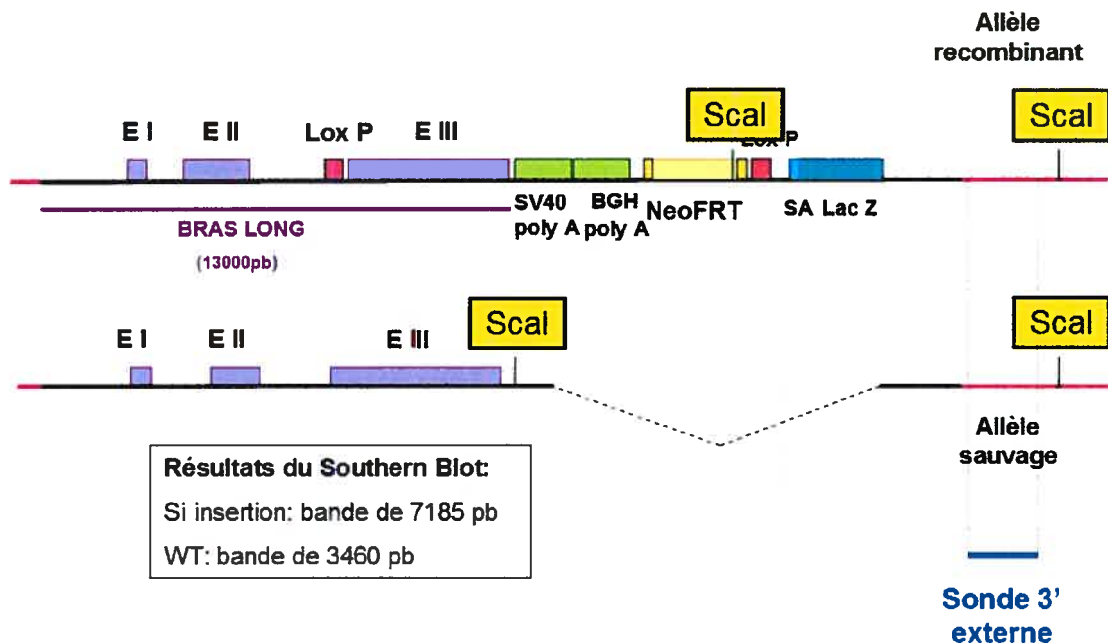


**Figure 16 : Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes par Southern Blot avec une sonde 5' externe. A. Profil théorique des allèles sauvages et recombinés. B. Résultats du Southern Blot : l'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction PacI et Ascl. Une sonde radioactive 5'externe a permis de visualiser les bandes sauvages (20kb) et recombinantes (15kb). CK35 correspond aux cellules souches embryonnaires sauvages. IC5 et IIIIF6 sont des clones recombinants possédant les deux allèles sauvage et recombinés.**

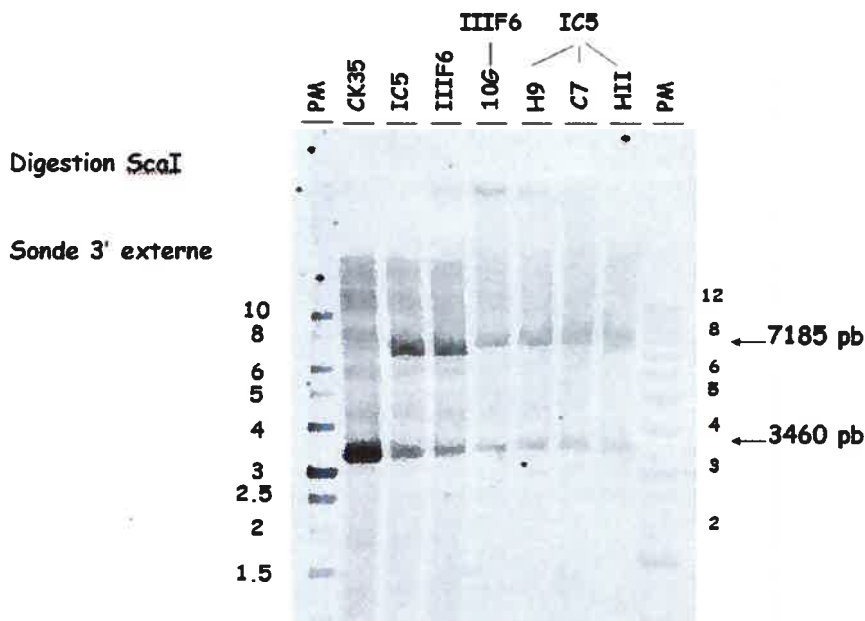
La seconde sonde utilisée pour cribler les clones de cellules souches embryonnaires est la sonde 3' externe. Cette sonde de 450 pb a été amplifiée par

PCR à l'aide des oligonucléotides 5' AAAGGCACCACCATGCCCCAT 3' et 5' ACTGA-ATCTCACCCTGTGCC 3' à partir d'ADN génomique des cellules CK35 sauvages. L'ADN génomique des cellules sauvages (CK35) et des clones recombinants a été digéré par l'enzyme *ScaI* puis hybridé avec la sonde 3' externe. La discrimination des clones positifs se fait par la présence d'une bande de 7185 pbs correspondant à une insertion correcte de la cassette de recombinaison sur un allèle, et une bande de 3460 pbs correspondant à l'allèle sauvage (Figure 17).

A/



B/



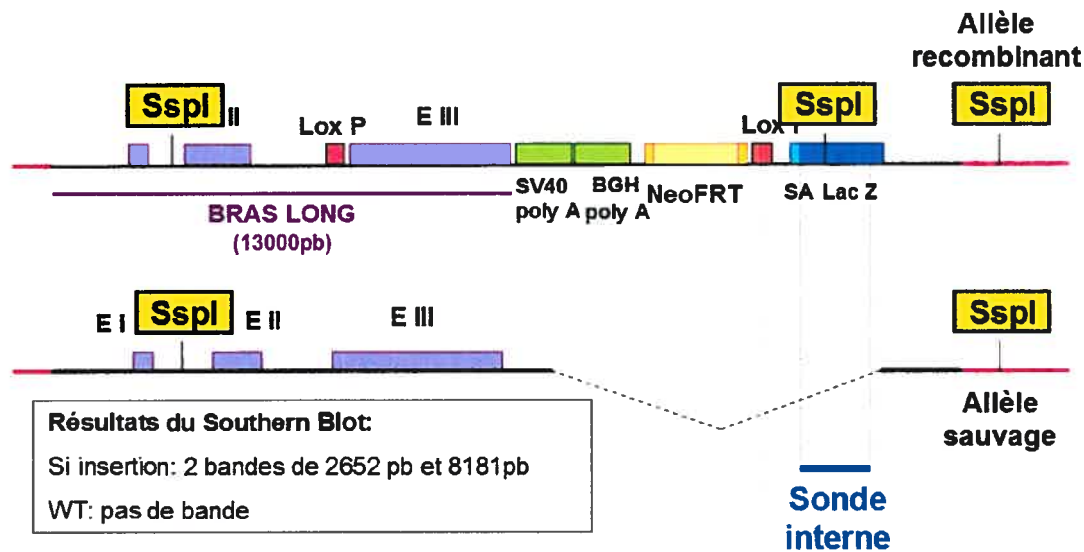
**Figure 17 : Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes par Southern Blot avec une sonde 3' externe. A. Profil théorique des allèles sauvages et recombinés. B. Résultats du Southern Blot : l'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction *ScaI*. La sonde radioactive 3'externe a permis de visualiser les bandes sauvage (3460 pb) et recombinante (7185pb). CK35 correspond aux cellules souches embryonnaires sauvages. IC5 et IIF6 sont des clones recombinants possédant les deux allèles sauvage et recombiné.**

Sur la piste correspondant aux cellules CK35 sauvages, une seule bande à 3460 pb est visible, alors que les clones IC5 et IIF6 présentent deux bandes à 3460 pb et 7185 pb correspondant aux deux allèles sauvage et recombinant. L'intensité de la bande unique présente chez les cellules sauvages correspond à la présence de deux allèles. Pour les clones recombinants, l'intensité des bandes est deux fois plus faible puisque les deux allèles sont distingués par deux tailles différentes.

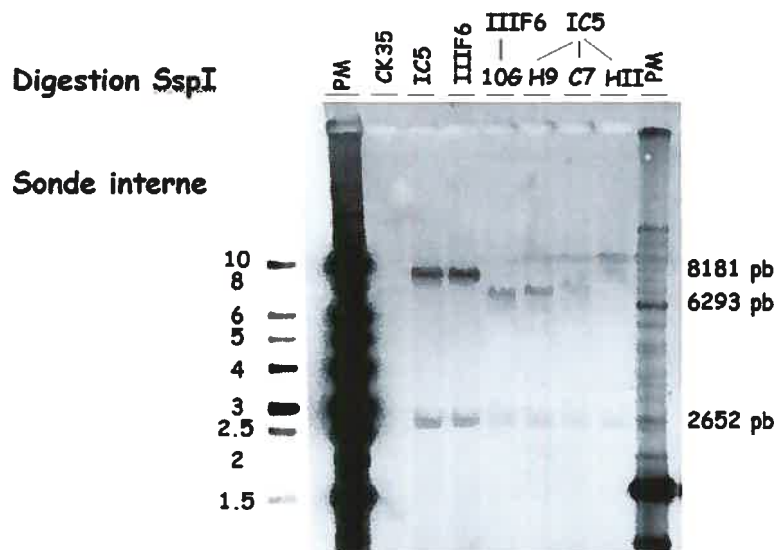
Enfin, l'insertion unique de la cassette de recombinaison dans le génome des cellules souches embryonnaires est vérifiée grâce à la sonde interne après digestion de l'ADN génomique avec l'enzyme *SspI*. Cette sonde interne correspondant au gène rapporteur *LacZ* permet de visualiser le nombre et l'intensité des bandes révélées. Elle a été générée par restriction enzymatique du vecteur positif de criblage (cf Figure 14). La digestion par *EcoRV* et *BglI* a permis de purifier deux fragments de 961 et 1160 pb correspondant à la sonde interne. La sonde interne correspond donc à un mélange de deux sondes s'hybridant spécifiquement sur la séquence du gène de la  $\beta$ -galactosidase. Un clone recombinant correct ne présente que deux bandes à 8181 pb et 2652 pb d'une intensité moyenne. La figure 18 présente la stratégie et les résultats du criblage obtenus avec la sonde interne. Cette sonde spécifique de la cassette de recombinaison permet de vérifier s'il n'y a pas eu d'insertion aléatoire ou d'insertion en concatémères. En effet, la présence de bandes multiples, ou la présence de bandes ne correspondant pas aux tailles attendues permet de visualiser les éventuelles recombinaisons ou insertions aléatoires dans le génome. La piste CK35 correspondant aux cellules souches embryonnaires sauvages ne montre aucune bande. Les pistes correspondant aux clones IC5 et IIF6 révèlent la présence des deux bandes de 8181 pb et 2652 pb correspondant aux bandes attendues pour une insertion correcte et unique de la cassette de recombinaison sur un des allèles.



A.



B.



**Figure 18 : Criblage des cellules souches embryonnaires recombinantes par Southern Blot avec une sonde interne.** A. Profil théorique des allèles sauvages et recombinés. B. Résultats du Southern Blot : l'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction SspI. La sonde radioactive interne permet de visualiser les bandes recombinantes de 8181 pb et 2652 pb. CK35 correspond aux cellules souches embryonnaires sauvages. IC5 et IIF6 sont des clones recombinants possédant les deux bandes correspondant à l'insertion de la cassette de recombinaison.

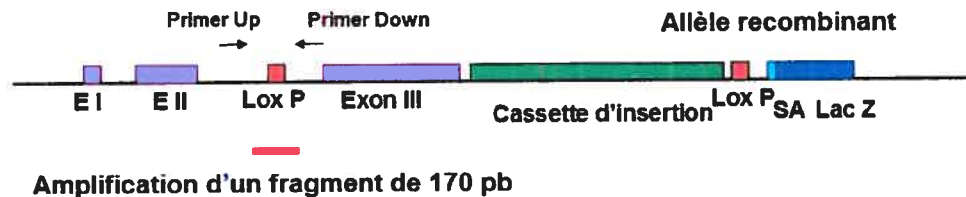
L'analyse par Southern Blot avec les trois types de sondes nous a permis de sélectionner deux clones de cellules souches embryonnaires recombinantes, les clones IC5 et IIIF6.

### c. Vérification de la présence du loxP en 5' de l'exon 3

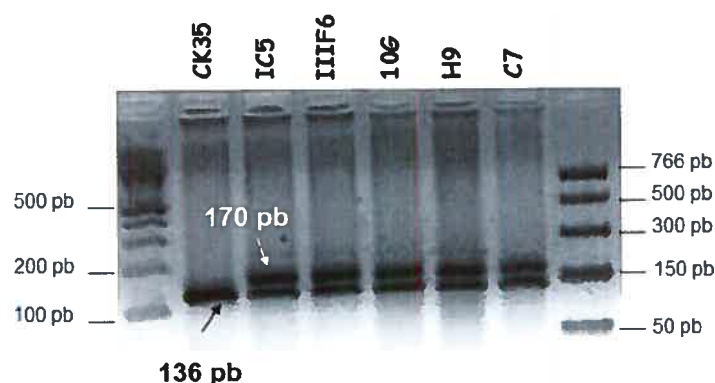
La vérification de la présence de ce site est essentielle puisqu'il interviendra lors de la recombinaison avec la recombinase Cre pour éliminer l'exon 3 dans les souris transgéniques au niveau des cellules germinales ou au niveau de types cellulaires spécifiques.

Une analyse par PCR permet de mettre en évidence la présence de ce site. Des oligonucléotides (5' GAGTCGTCTACACCCTCTGCCT 3' et 5' AAATGCTGTCGGGTTTGGTGAG 3') placés de part et d'autre du site LoxP situé en 5' de l'exon 3 permettent une amplification d'un fragment de 170 pb en présence du site loxP et un fragment de 136 pb en l'absence du site (Figure 19).

A/



B/



**Figure 19 : Présence du site LoxP en 5' de l'exon 3 de CLC.** A. Schéma représentant la disposition des oligonucléotides permettant de discriminer la présence ou l'absence du site LoxP en 5' de l'exon 3. 5' GAGTCGTCTACACCCTCTGCCT 3' et 5' AAATGCTGTCGGGTTTGGTGAG 3' sont les deux oligonucléotides utilisés pour le criblage. B. La réaction de PCR révèle que seules les cellules sauvages CK35 ne possèdent pas le site LoxP. La présence des deux bandes de 170 pbs et 136pbs pour les autres clones recombinants met en évidence le site LoxP en 5' de l'exon 3. Les clones 10G, H9 et C7 sont les clones où le gène de la néomycine a été éliminé.

Les bandes visibles à 136 pb et 170 pb justifient la présence du site LoxP en 5' de l'exon pour les clones IC5 et IIF6 : un des allèles est l'allèle recombiné, l'autre est l'allèle sauvage. Une seule bande à 136 pb est visible pour les cellules souches embryonnaires sauvages CK35 correspondant aux deux allèles sauvages.

#### 4. Excision du gène de résistance

D'un point de vue éthique, l'insertion d'un gène de résistance exogène dans une espèce n'est pas recommandée. La présence du gène de sélection dans les modèles transgéniques présente en effet des inconvénients quant à l'analyse du phénotype final. Ces marqueurs associés aux allèles ciblés portent des séquences promotrices et enhancer qui peuvent interférer avec d'autres gènes liés au locus ciblé (Kim *et al*, 1992; Fiering *et al*, 1993; Braun *et al*, 1994; Olson *et al*, 1996). Ces perturbations sur l'expression des gènes peuvent avoir une longue portée (distance supérieure à 100 kb) (Pham *et al*, 1996). Ainsi l'analyse du phénotype mutant peut être confuse puisqu'une telle construction peut être considérée comme un double mutant. C'est pourquoi, pour limiter les complications d'interprétation des phénotypes, il est préférable d'éliminer les marqueurs de sélection. De plus, le gène bactérien de la néomycine présente des sites d'épissage énigmatiques qui perturbent l'épissage normal et qui réduit la quantité des transcrits corrects (Carmeliet *et al*, 1996; Meyers *et al*, 1998; Nagy *et al*, 1998). Son élimination est donc recommandée de façon à obtenir des résultats satisfaisants.

C'est pourquoi, l'élimination du gène de résistance à la néomycine a été réalisée *in vitro* de façon à injecter dans les blastocystes des cellules souches embryonnaires ne portant que les modifications nécessaires à notre étude.

Une des alternatives pour éliminer le gène de résistance est de transfecter de façon transitoire les cellules souches embryonnaires recombinées avec un vecteur d'expression codant pour la FLP recombinase (Joyner, 2001; Kühn and Schwenk, 2001). La fréquence de délétion dans les clones de cellules souches embryonnaires avec la recombinase FLP est habituellement de 5 à 50%, il n'est donc pas nécessaire de rajouter un gène de sélection négative pour enrichir la production de clones recombinants (Joyner, 2001). En revanche, la recombinaison entre les sites FRT correspond seulement à un événement de

délétion par recombinaise. Il faut donc transfecter les cellules souches embryonnaires avec une grande quantité de vecteur codant pour cette recombinaise, de façon à maximiser la recombinaison et diminuer le nombre de clones à analyser.

Les clones IC5 et IIIF6 sélectionnés précédemment ont été soumis à l'action de la FLP recombinaise. Les clones ont été électroporés avec le plasmide pOG44 (Invitrogen) codant pour la recombinaise FLP thermosensible. Cette enzyme est inactive à 37°C, donc les 400 clones analysés se sont révélés négatifs pour la délétion du gène de résistance. Dans un deuxième temps, les clones ont été électroporés avec le plasmide pCAGGS-FLPe (GeneBridge) codant pour la FLP recombinaise modifiée la rendant active à 37°C. 120 clones ont été analysés.

L'identification des clones où le gène de résistance a été délété est réalisée avec la même précision et les mêmes techniques que celles utilisées pour le criblage des cellules souches ayant intégrées la cassette de recombinaison. C'est-à-dire qu'une première analyse par PCR a permis de discriminer les clones où la recombinaison entre les sites FRT a eu lieu. Des amorces externes au gène de résistance permettent d'amplifier un fragment de 300 pb quand l'excision a eu lieu. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus par PCR ont été confirmés par Southern Blot avec les trois types de sondes décrites dans le paragraphe précédent. L'excision du gène de résistance faisant intervenir une étape d'électroporation supplémentaire, cette analyse permet de vérifier l'absence de réarrangements qui peuvent éventuellement avoir lieu dans le génome. L'analyse des Southern Blots avec les sondes 5' (Figure 16) et 3' (Figure 17) donne les mêmes résultats en l'absence ou en présence du gène de résistance à la néomycine. Le clone 10G issu de la recombinaison du clone parent IIIF6 et les clones H9, C7 et H11 issus du clone parent IC5 présentent les bandes attendues avec les sondes 5' externe et 3' externe (Figures 16 et 17).

La digestion avec l'enzyme *SspI* dans les clones où le gène de résistance a été éliminé donne des fragments de 2652 pb et 6293 pb au lieu de 8181pb. La sonde interne permet donc de révéler ces deux bandes de 2652 et 6293 pb dans les clones ne possédant plus la néomycine. Les résultats sont présentés sur la figure 18.

Enfin, la dernière vérification réalisée est la PCR permettant de visualiser la présence du site LoxP en position 5' de l'exon 3 de CLC. La figure 19 présente les résultats obtenus pour les clones possédant ou non le gène de résistance à la néomycine.

Ainsi, les clones IC5, H9, IIIF6 et 10G semblent corrects pour être injectés dans les blastocystes. Cependant, il est à noter que cette manipulation supplémentaire pendant la culture des cellules souches embryonnaires requiert plus d'efforts et augmente la probabilité que le clone cible puisse perdre sa capacité à envahir la lignée germinale. Une autre alternative à cette recombinaison *in vitro* est de réaliser des croisements et d'exciser le gène de résistance *in vivo*. En croisant avec une souche de souris FLP délétère, le gène de résistance à la néomycine est éliminé pendant la transmission germinale donnant ainsi un allèle recombiné flanqué des sites LoxP permettant de réaliser le Knock-In conditionnel (Rodriguez *et al*, 2000; Kanki *et al*, 2006).

## **5. Analyse des caryotypes**

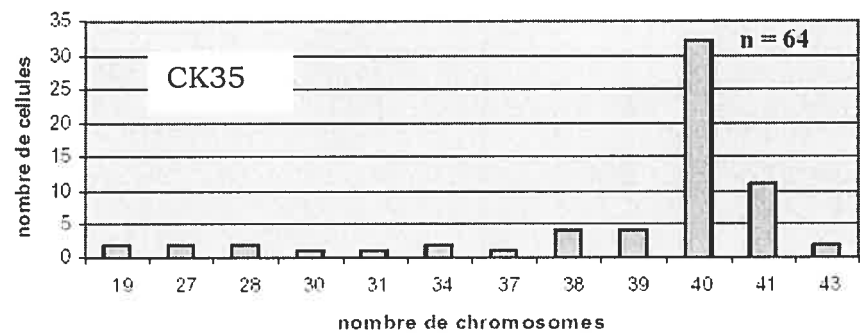
Les cellules souches embryonnaires ont été soumises à plusieurs électroporations. Cette technique est connue pour générer des aberrations chromosomiques menant à une diminution du nombre de souris chimériques obtenues après injection dans les blastocystes, à une diminution de la fertilité des souris chimériques et à une perte de la capacité des cellules souches à coloniser la lignée germinale.

L'analyse des caryotypes des cellules souches sélectionnées permet de visualiser toute modification dans le nombre de chromosomes. Les cellules murines possèdent 19 paires de chromosomes et une paire de chromosomes sexuels, soit 40 chromosomes. Le caryotype des cellules souches embryonnaires sauvages CK35 à partir desquelles nous avons établi les lignées de cellules souches recombinantes et celui des cellules recombinantes sélectionnées ont été déterminés. L'analyse des caryotypes montre que les cellules sauvages CK35 présentent un caryotype normal : plus de 65% des cellules possèdent 40 chromosomes (Figure 20A). Les cellules d'origine ne présentent pas d'anomalie, elles ont une euploïdie normale. En revanche, le caryotype des cellules issues du clone recombinant IC5 présente une anomalie avec 41 chromosomes. 60% des

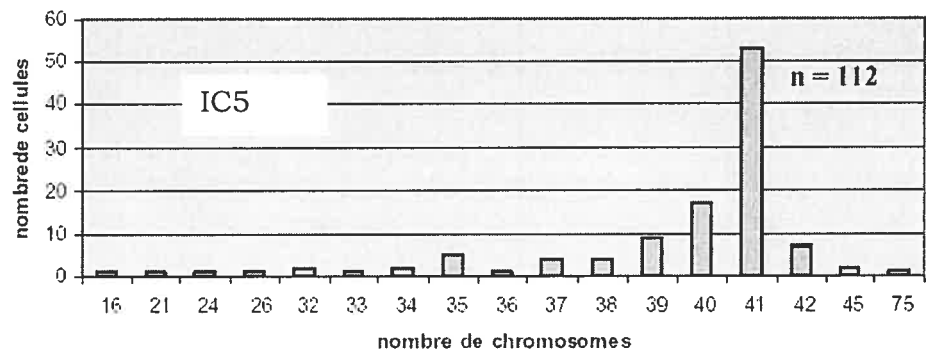
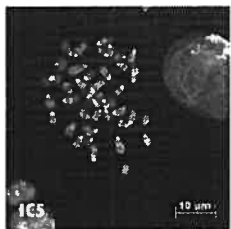
cellules analysées présentent une aneuploïdie avec une trisomie (Figure 20B). Toutes les cellules ne possédant pas le gène de résistance issues de ce clone ont donc un caryotype anormal (H9, C7, HII). Les cellules issues du clone IC5 ne pourront pas être utilisées pour l'injection dans les blastocystes.

Le caryotype des cellules issues du clone recombinant IIIF6 présente une euploïdie normale. 73% des cellules analysées présentent 40 chromosomes (Figure 20C). Les cellules G10 ne possédant pas le gène de résistance issues de ce clone ont un caryotype normal (Données non montrées) : 75% des cellules possèdent 40 chromosomes. Les cellules issues du clone IIIF6 et G10 pourront être utilisées pour l'injection dans les blastocystes.

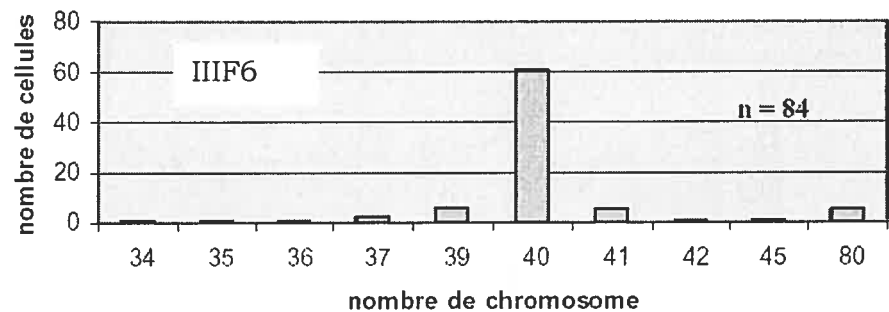
**A/**



**B/**



**C/**



**Figure 20 : Caryotype des cellules souches embryonnaires.** Les chromosomes des cellules ont été comptés puis répertoriés. N correspond au nombre de cellules comptées pour chaque clone. **A.** Caryotype des cellules souches sauvages CK35. **B.** Caryotype des cellules souches embryonnaires recombinantes : clone IC5. **C.** Caryotype des cellules souches embryonnaires recombinantes : clone IIF6.

## **E. Génération des souris transgéniques**

### **1. Choix des blastocystes**

Dans les blastocystes, la lignée cellulaire CK35 issue d'une souche de souris 129 possède un fort potentiel de colonisation des cellules germinales. En général, dans les expériences de recombinaison homologue, 12 à 15 cellules souches embryonnaires sont injectées par blastocyste pour obtenir des chimères avec un taux de chimérisme correct et une bonne colonisation de la lignée germinale (Joyner, 2001). Cependant, pour la lignée CK35, il suffit de 5 cellules sauvages ou 8 à 10 cellules recombinantes injectées par blastocyste pour obtenir un fort taux de chimérisme et une colonisation de la lignée germinale (Kress *et al*, 1998). Au-delà de ce nombre, un fort chimérisme pourra être obtenu mais avec une augmentation du pourcentage de stérilité des chimères.

Concernant les blastocystes, deux sortes peuvent être utilisées. Les blastocystes FVB issus de souris consanguines de la lignée Swiss. Le pelage de ces souris est blanc (albinos). Ces blastocystes sont utilisés pour la production de souris transgéniques car les souris ont une superovulation très efficace et le pronucléus de zygote est très gros donc très facile à prélever. L'inconvénient de cette souche est qu'elle est peu permissive à l'implantation des cellules CK35 (Schwartzberg *et al*, 1989). L'autre type de blastocyste utilisé est celui issu de la souche C57BL/6. Le principal avantage de ces blastocystes est qu'ils sont bien permissifs aux cellules CK35. Celles-ci colonisent relativement facilement la lignée germinale (Schwartzberg *et al*, 1989). De plus, ces souris sont de couleur noire et le génotype de la couleur du pelage est connu. En effet, les gènes déterminant la couleur du pelage des souris sont nombreux et ce sont des gènes liés. Il en existe au moins 4 qui régissent la couleur (A :agouti; B :brown; D :dilute; C :albinos;...). L'allèle C étant épistatique, il masque à l'état homozygote (c/c) l'expression des autres loci déterminant la couleur du pelage, en particulier les séries alléliques A, B, D. Les souris c/c sont blanches quelque soit le génotype des autres gènes de couleur (cas des souris FVB). En revanche, à l'état hétérozygote (C/c) ou homozygote dominant (C/C), ce sont les autres gènes qui déterminent la couleur du pelage. L'avantage d'utiliser les blastocystes issus de la lignée consanguine C57BL/6 de génotype a/a B/B C/C D/D est qu'ils ne possèdent pas de forme



allélique agouti sauvage (A), et donc après injection des cellules souches CK35, les phénotypes agoutis observés sur la descendance seront d'origine allélique CK35 et ils s'exprimeront de façon dominante par rapport à l'allèle non-agouti (a) de la C57BL/6. Ces blastocystes permettent donc un criblage plus aisé de la descendance des souris chimériques.

## **2. Injection dans les blastocystes des cellules souches embryonnaires recombinantes sélectionnées et obtention des chimères.**

L'injection des cellules sauvages permet de vérifier la totipotence de ces cellules. 5 cellules souches embryonnaires sauvages CK35 ont été injectées dans des blastocystes FVB et C57BL/6. Malgré un caryotype normal et une morphologie normale, aucun élément ne permet de valider leur totipotence. En effet, si elles sont différenciées, elles ne coloniseront jamais la lignée germinale, et aucune chimère ne pourra transmettre la mutation à la descendance.

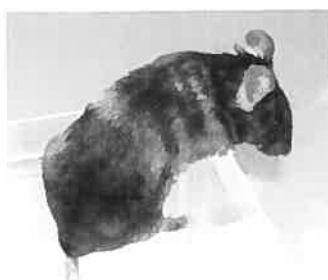
8 à 10 cellules souches recombinantes issues des clones IIF6 et G10 ont été injectées dans les deux types de blastocystes. Après injection des cellules dans les blastocystes. Ceux-ci ont ensuite été réimplantés dans des femelles pseudo-gestantes. Deux femelles pseudo gestantes ont reçu 5 à 6 blastocystes injectés avec les cellules sauvages. Une seule a développé une gestation (prise de poids), mais n'a semble-t-il pas pu mettre bas. Aucun souriceau n'est né de cette réimplantation. Pour le clone IIF6, trois femelles ont été réimplantées. Deux ont présenté une gestation et ont donné naissance à 7 animaux chimériques (pelage agouti sur fond noir), et un animal sauvage (pelage noir) (Figure 21). Enfin, pour le clone G10, deux femelles ont reçu 7 à 10 blastocystes injectés et ont développé une gestation. Une seule des femelles a donné naissance à 2 souriceaux chimériques.

Les animaux nés des réimplantations des blastocystes injectés avec des cellules souches embryonnaires recombinantes présentent un pourcentage de chimérisme variant de 1 à 90 %. Le ratio mâle/femelle obtenu est d'environ 1:1.

A/



B/



**Figure 21 : Souris chimériques.** A. Comparaison entre une souris chimérique et une souris sauvage. B. Chimérisme agouti sur fond noir d'une souris issue d'une réimplantation de blastocyste injecté avec des cellules souches recombinantes.

Les caractéristiques des chimères obtenues sont répertoriées dans le tableau 2.

Clone injecté	N° de la souris	Sexe	Chimérisme
<b>G10</b>	<b>1</b>	<b>mâle</b>	<b>30%</b>
	<b>2</b>	<b>femelle</b>	<b>40%</b>
<b>III F6</b>	<b>10</b>	<b>mâle</b>	<b>90%</b>
	<b>11</b>	<b>mâle</b>	<b>30%</b>
	<b>12</b>	<b>mâle</b>	<b>40%</b>
	<b>13</b>	<b>mâle</b>	<b>20%</b>
	<b>14</b>	<b>femelle</b>	<b>30%</b>
	<b>15</b>	<b>femelle</b>	<b>10%</b>
	<b>16</b>	<b>femelle</b>	<b>1%</b>

**Tableau 2 : Caractéristiques des chimères obtenues.**

### 3. Études de la transmission germinale

Les chimères obtenues précédemment ont été sevrées puis mises en accouplement pour valider la capacité des cellules recombinantes à coloniser la lignée germinale. Les souris chimériques ont été croisées avec des souris sauvages de la lignée C57BL/6. La couleur du pelage nous permettra de sélectionner les petits ayant intégré la cassette de recombinaison au niveau de la lignée germinale. En effet, la couleur du pelage est un critère de sélection. L'allèle agouti est un allèle dominant. Seules les cellules souches embryonnaires recombinantes possèdent cet allèle. Les cellules issues des souris C57BL/6 possèdent des allèles récessifs pour le phénotype agouti. Ainsi, si les cellules recombinantes ont envahi la lignée germinale dans les souris chimériques, la descendance de ces souris pourra porter l'allèle dominant agouti et ainsi avoir un pelage de couleur agouti contrairement aux petits sauvages de couleur noir qui n'ont pas reçu les cellules souches recombinantes dans leur lignée germinale.

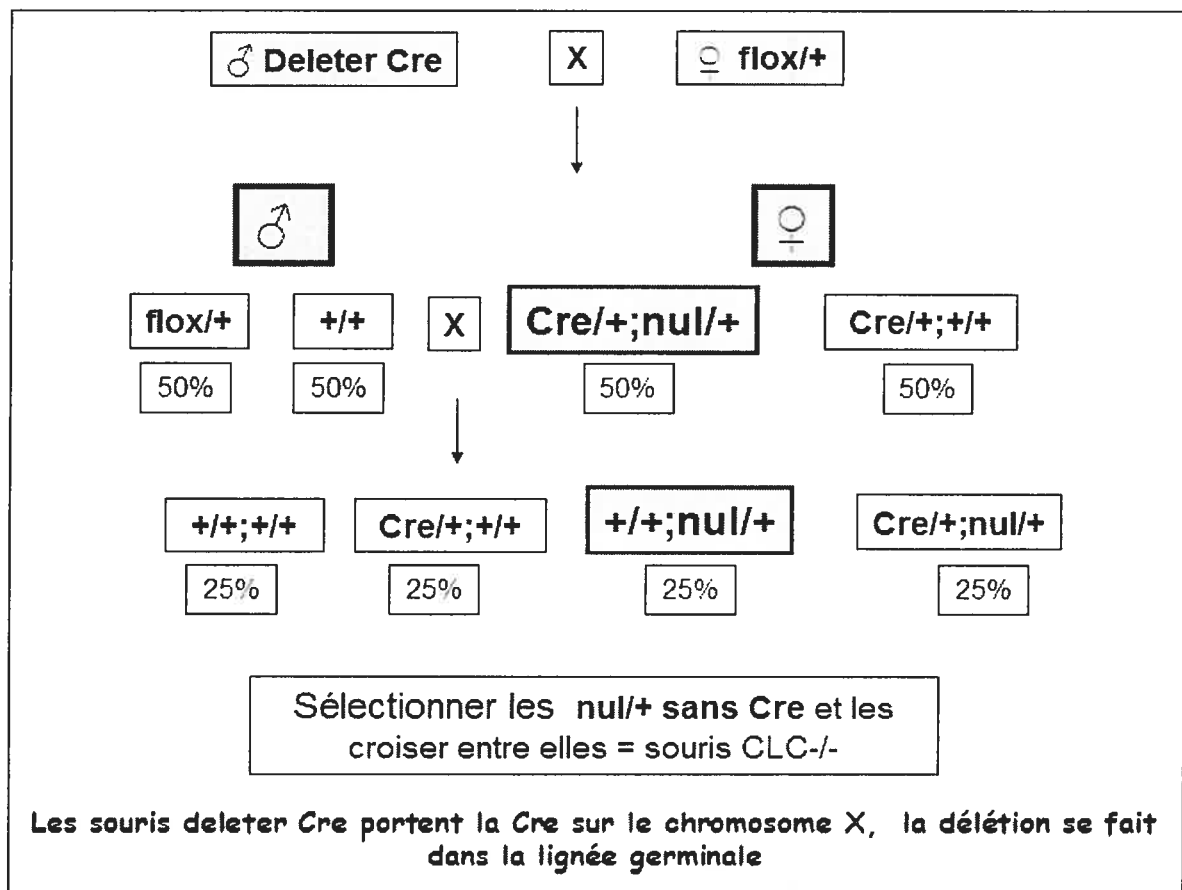
La lignée germinale de la souris chimérique n'est pas forcément envahie à 100% par les cellules souches recombinantes (Kress *et al*, 1998). Pour vérifier cette hypothèse et vérifier si la mutation est transmise à la descendance, il est nécessaire de cribler entre 50 et 200 petits par chimère. Pour les mâles, ce nombre de petits est envisageable, mais pour les femelles chimériques, il est nécessaire de multiplier le nombre de naissances jusqu'à la mort de l'animal.

Deux mâles chimériques présentent une stérilité. Un des mâles semble avoir une tumeur au niveau du ventre ce qui expliquerait sa stérilité. Les quatre femelles chimériques ont donné naissance à 48 petits présentant un pelage de couleur noir. La transmission n'a pas eu lieu. Mais comme nous l'avons décrit précédemment, les souris chimériques femelles transmettent en général moins facilement l'allèle muté à cause des modifications chromosomiques qui peuvent survenir. 109 petits ont été obtenus à partir des mâles chimériques fertiles, mais aucune transmission germinale n'a encore été observée. A l'heure actuelle, les mâles sont encore en accouplement, et l'analyse de leur descendance est en cours. Les mâles chimériques sont plus prometteurs et permettent de donner un nombre important de descendants.

## **F. Inactivation du gène *clc***

L'objectif du projet est d'étudier le rôle de CLC dans le développement des systèmes nerveux et immunitaire à l'aide d'une souris transgénique où le gène de CLC est inactivé de façon conditionnelle. Quand l'allèle muté sera transmis dans la lignée germinale, nous obtiendrons des souris hétérozygotes pour CLC, c'est-à-dire que le génotype sera composé d'un allèle sauvage de CLC noté « + », et d'un allèle floxé où l'exon III sera flanqué des sites LoxP, noté « flox ».

Pour obtenir une souris où le gène est inactivé dans tout l'organisme dès les premiers stades du développement, plusieurs croisements sont nécessaires. La délétion du gène de CLC dépend de l'expression de la Cre recombinase. Les souches Cre délétères expriment la Cre recombinase dans les cellules germinales ou durant l'embryogenèse précoce de telle sorte que toute ou partie de la descendance contient le gène cible délété dans la lignée germinale (Rodriguez *et al*, 2000), (Meyers *et al*, 1998). Ces souris délétères portent le gène de la Cre recombinase sur le chromosome X. Pour obtenir des souris nulles homozygotes pour CLC, un schéma de croisement est présenté en Figure 22.

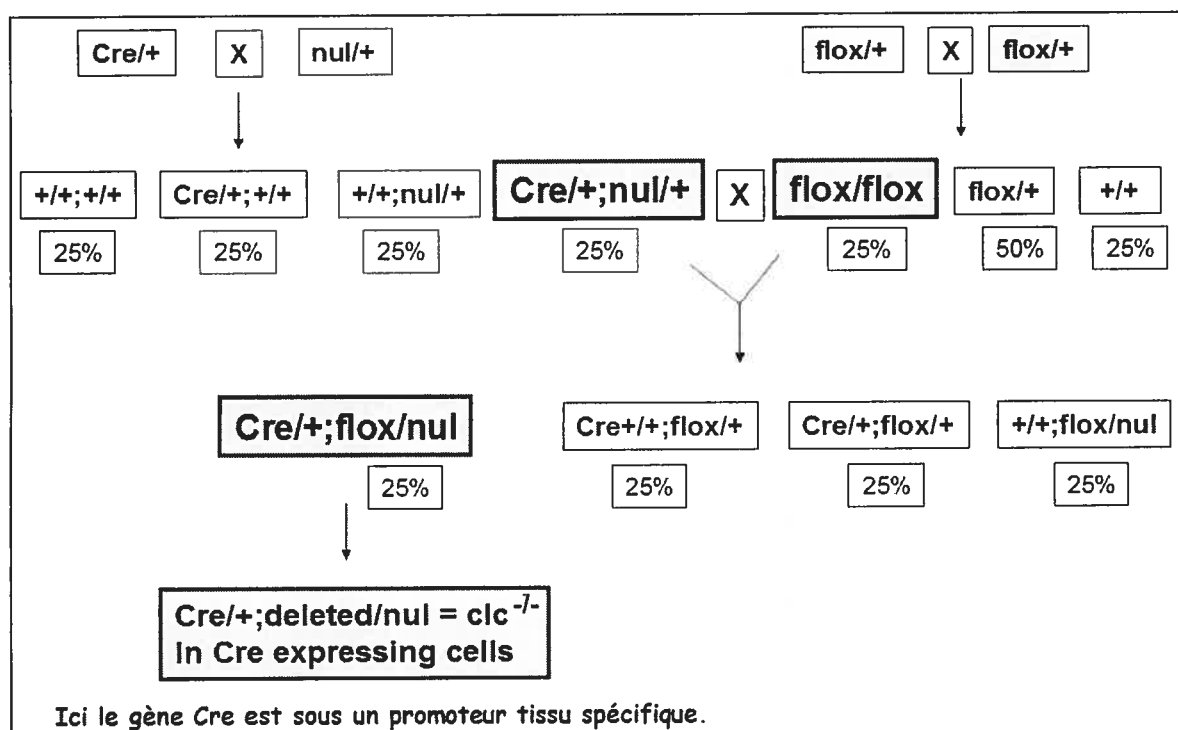


**Figure 22 : Obtention d'une souris nulle pour clc.**

En croisant des souris mâles Cre délétères avec des souris femelles hétérozygotes floxées pour CLC, la descendance nous permettra de sélectionner les femelles qui auront incorporé la Cre recombinase sur le chromosome X provenant de leur père. La moitié de ces femelles porteront l'allèle floxé provenant de leur mère. Ainsi, ces souris auront un génotype « Cre/+; floX/+ ». L'action de la Cre recombinase va entraîner la délétion de l'exon III de CLC donc le génotype sera « Cre/+; Nul/+ » (Figure 22). Après génotypage de ces souris, elles seront croisées avec des mâles sauvages homozygotes pour CLC « +/+ » et n'exprimant pas la Cre recombinase. Ce croisement nous permettra d'éliminer le gène de la Cre recombinase dans le génome des souris. La moitié de la descendance ne portera pas l'allèle de la recombinase et 50% de ces souris porteront un allèle nul pour CLC, leur génotype sera donc « +/+; nul/+ ». A partir de ces souris, il sera possible d'établir une lignée de souris homozygote pour l'allèle nul de CLC en croisant ces souris entre elles. 25% de la descendance sera homozygote nul/nul

et le phénotype de ces souris sera étudié pour déterminer dans un premier temps si la mutation est létale.

Dans un deuxième temps, l'analyse du rôle de CLC sera réalisée dans des types cellulaires précis. En effet, à l'aide de souris transgéniques exprimant la Cre recombinase dans des types cellulaires précis, le rôle de CLC pourra être étudié. De nombreux promoteurs constitutifs ou spécifiques d'un type cellulaire ont été utilisés avec succès pour l'expression de la Cre recombinase dans des souris transgéniques, qui permettent le ciblage conditionnel d'un gène dans une variété de tissus (Rajewsky *et al*, 1996; Joyner, 2001). La figure 23 présente une stratégie de croisement pour obtenir une inactivation du gène de CLC dans un type cellulaire précis ou un stade de développement donné. Les souris hétérozygotes portant un allèle nul pour CLC « +/nul » sont croisées avec des souris hétérozygotes exprimant la Cre recombinase sous un promoteur spécifique « Cre/+ ». Un quart de la descendance aura un génotype « Cre/+; Nul/+ » c'est-à-dire que les souris auront un allèle nul pour CLC et un allèle sauvage, et elles posséderont également un allèle codant pour la Cre recombinase. En parallèle, les souris hétérozygotes floxées pour CLC seront croisées entre elles de façon à obtenir des souris homozygotes floxées pour CLC : 25% de la descendance sera « flox/flox ». Ces souris « flox/flox » sont croisées avec les souris hétérozygotes « Cre/+; Nul/+ ». L'allèle floxé sera transmis à toute la descendance et la ségrégation va dépendre des parents hétérozygotes. Les gènes codant pour la Cre recombinase et pour CLC étant indépendants, la descendance donnera dans 25% des cas une descendance possédant les allèles Cre et Nul, soit un génotype « Cre/+; flox/nul ». Comme l'expression de la Cre recombinase dépend d'un promoteur spécifique, l'inactivation du gène de CLC sera dépendante de l'activation de ce promoteur et se fera donc dans un type cellulaire ou à un stade du développement précis. Seules les cellules exprimant la Cre recombinase seront inactivées pour le gène de CLC.



**Figure 23 : Obtention d'une souris nulle pour CLC dans un tissu spécifique**

Une des limites de l'utilisation de souris Cre dans l'étude de l'expression et de la fonction d'un gène réside dans le fait que la demi-vie de l'ARN ou de la protéine codant pour le gène cible peut limiter l'efficacité de cette approche. Si le produit du gène est très stable, sa destruction sera retardée par rapport à l'altération génétique induite, masquant ainsi la déficience du mutant (Joyner, 2001).

## G. Perspectives

La stratégie mise en place pour générer cette souris transgénique permet d'inactiver l'exon III de CLC et d'exprimer le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur de CLC. Ainsi, l'analyse du profil d'expression de CLC sera déterminé grâce à l'expression de la  $\beta$ -galactosidase qui peut facilement être détectée par histochimie ou cytométrie de flux (Berger *et al*, 1994; Weiss *et al*, 1999). Les souris inactivées pour CLC nous permettront de suivre l'évolution de son expression tout au long du développement embryonnaire et adulte à condition que l'inactivation ne soit pas létale. Dans le cas contraire, ce système

d'analyse nous permettra de savoir à quel stade précis du développement, cette inactivation devient létale.

Le croisement des souris *CLC<sup>-/-</sup>* conditionnelles avec des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase dans des types cellulaires appropriés nous permettra d'étudier la fonction de CLC dans des organes ou des types cellulaires donnés. En particulier, le croisement avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le promoteur *Emx1*, qui est fonctionnel dans les cellules de la crête neurale, dans la lignée neuroépithéliale, dans les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules gliales, nous permettra de déterminer le rôle de CLC dans le système nerveux (Gorski *et al*, 2002).

De plus, CLC semble avoir un rôle dans le système immunitaire au niveau des lymphocytes B (Senaldi *et al*, 2002). En croisant les souris « +/nul » avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le promoteur CD-19 spécifique des lymphocytes B, il nous sera possible d'étudier le rôle de CLC dans cette lignée cellulaire (Rickert *et al*, 1997).

Enfin, une des hypothèses avancées est que CLC pourrait avoir un rôle protecteur sur les oligodendrocytes et donc serait susceptible d'être un facteur de protection dans la sclérose en plaques, maladie entraînant une dégénérescence de la gaine de myéline des oligodendrocytes. Un modèle murin de cette maladie est le modèle de l'EAE. Dans ce modèle, des lésions inflammatoires démyélinisantes sont induites chez l'animal par injection systémique de différents constituants peptidiques de la myéline comme la protéine basique de la myéline (MBP), la « myelin oligodendrocytes glycoprotein » (MOG) et la protéine protéolipidique (PLP) (Pettinelli and McFarlin, 1981; Yamamura *et al*, 1986; Genain *et al*, 1996). L'évaluation du rôle protecteur de CLC dans ce modèle pourra être étudiée par induction de la maladie dans les souris déficientes pour CLC. Ainsi, une exacerbation des symptômes de cette maladie serait due à une déficience en CLC. En inactivant spécifiquement le gène de CLC dans les oligodendrocytes, les effets de la déficience en CLC nous permettront d'étudier la survie des oligodendrocytes et la myélinisation des neurones.

Enfin, CLC partage le récepteur au CNTF avec la neuropoïétine et le CNTF. Ces cytokines ayant des effets redondants, l'élaboration d'une souris doublement



ou triplement invalidée pour ces gènes permettra de discriminer le rôle de chacune de ces cytokines. Une telle analyse a déjà été réalisée pour définir le rôle distinct de CNTF, LIF et CT-1 dans la survie des motoneurones (Holtmann *et al*, 2005).

En conclusion, un très grand nombre d'études phénotypiques et fonctionnelles pourront être réalisées grâce à cette souris transgénique. Les informations obtenues permettront de mieux comprendre le rôle et la fonction de CLC dans le développement et dans des modèles de maladies.

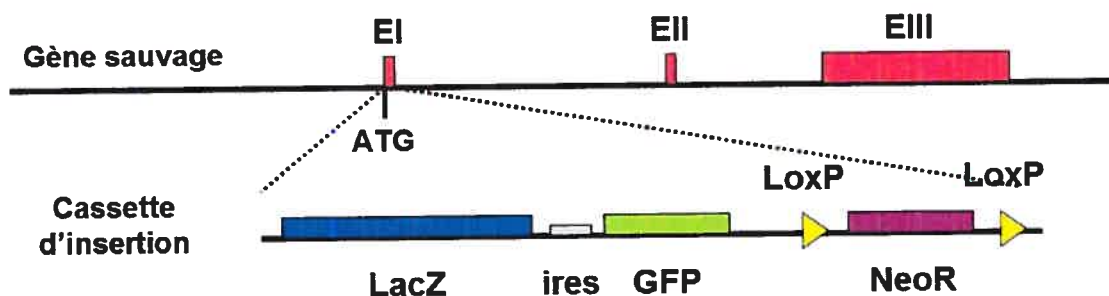
#### **IV. Description du Knock-Out de la neuropoïétine**

La neuropoïétine est le dernier ligand du récepteur au CNTF à avoir été découvert. Très peu de données concernant cette protéine sont disponibles. De plus, chez l'homme, la neuropoïétine n'est pas exprimée, elle se retrouve uniquement sous forme d'un pseudogène. Ainsi, nous avons décidé de générer une souris Knock-In où le gène de la neuropoïétine est invalidé en le remplaçant par un gène rapporteur.

##### **A. Stratégie et description du vecteur cible**

L'objectif est de créer un Knock-In en introduisant deux gènes rapporteurs, le gène de la  $\beta$ -galactosidase et le gène de la eGFP (Green Fluorescent Protein), qui seront exprimés sous le contrôle du promoteur de la neuropoïétine. Le gène de neuropoïétine est composé de trois exons. Une banque de cosmides murins provenant de RZPD a été criblée, et le gène de la neuropoïétine a été sélectionné. Le vecteur cible est construit de telle sorte que le codon initiateur ATG du gène de la neuropoïétine est immédiatement suivi par la région codante du gène de la  $\beta$ -galactosidase (Figure 24). Le gène de la eGFP est inséré en 3' du gène de la  $\beta$ -galactosidase après une séquence IRES (Internal Ribosomal Entry Site) permettant la production d'un ARN polycistronique et l'attachement d'un complexe ribosomal pour la traduction de la eGFP (Pelletier and Sonenberg, 1988). Le gène de la neuropoïétine étant pauvre en site de restriction, nous avons utilisé la recombinaison homologue catalysée par les gènes  $\lambda$  RED dans *E. coli* (Datsenko and Wanner, 2000; Testa *et al*, 2003) pour

insérer le gène rapporteur bicistronique *LacZ*-IRES-*EGFP* dans un des exons du gène de neuropoïétine. Les gènes rapporteurs sont flanqués de deux régions d'homologie du gène cible d'une taille variant de 2 à 7 kb. Le petit bras d'homologie de 2 kb est nécessaire pour le criblage par PCR des cellules souches embryonnaires.

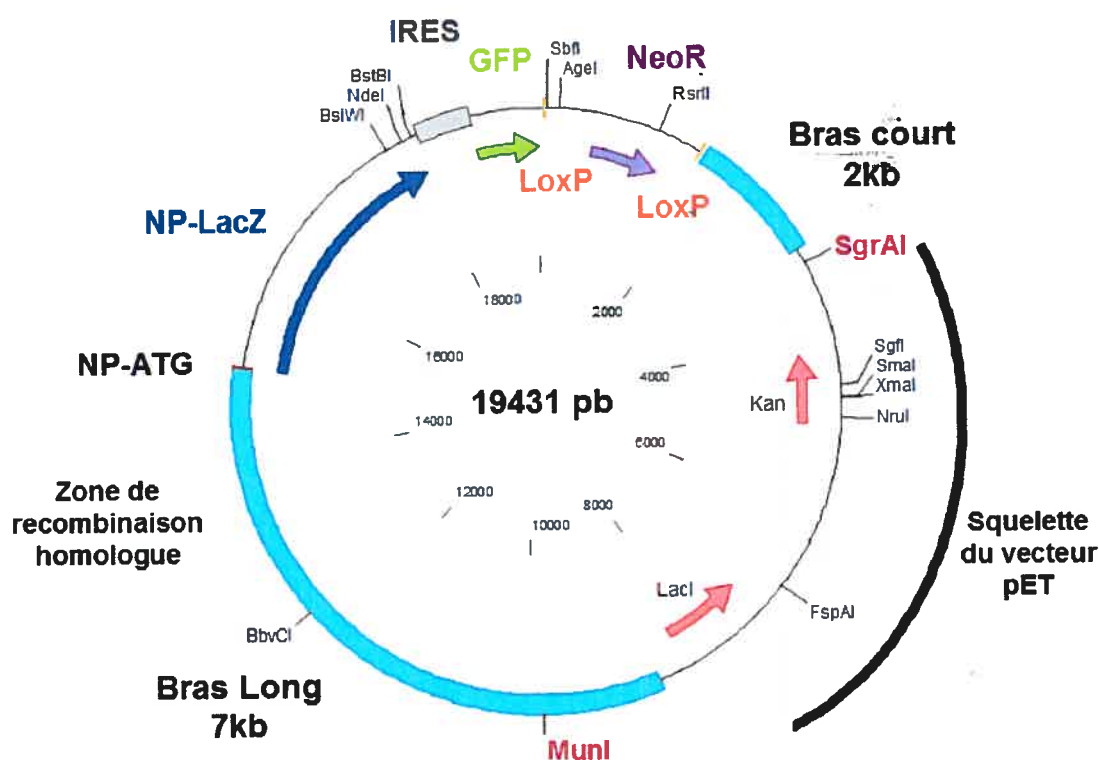


**Figure 24 : Stratégie Knock-In employée pour inactiver le gène de la neuropoïétine.** La cassette contenant les gènes rapporteurs codant pour la  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*) et la eGFP ainsi que le gène de résistance à la néomycine (*NeoR*) flanquée des sites *LoxP* a été insérée par recombinaison homologue au niveau de l'exon I de la neuropoïétine. La séquence IRES permet la synthèse de l'ARN polycistronique codant pour les deux gènes rapporteurs.

Le vecteur cible utilisé contient un gène de sélection, le gène de la résistance à la néomycine (*NeoR*) (Figure 24). La construction initiale comprenait le gène floxé de la CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) qui a été remplacé par recombinaison avec la Cre recombinase par le gène de la néomycine. Le gène de résistance est flanqué par deux sites *LoxP*. Le gène de sélection des cellules souches est inclus à l'intérieur du vecteur cible pour l'identification des clones ES recombinants, mais il doit être enlevé du génome de façon à minimiser la perturbation du gène cible. Cette élimination pourra être réalisée *in vitro* dans les cellules souches embryonnaires à l'aide d'un plasmide codant pour la Cre recombinase, avant l'injection dans les blastocystes. L'autre alternative sera d'utiliser des souris Cre délétères qui permettront l'élimination *in vivo* du gène de résistance.

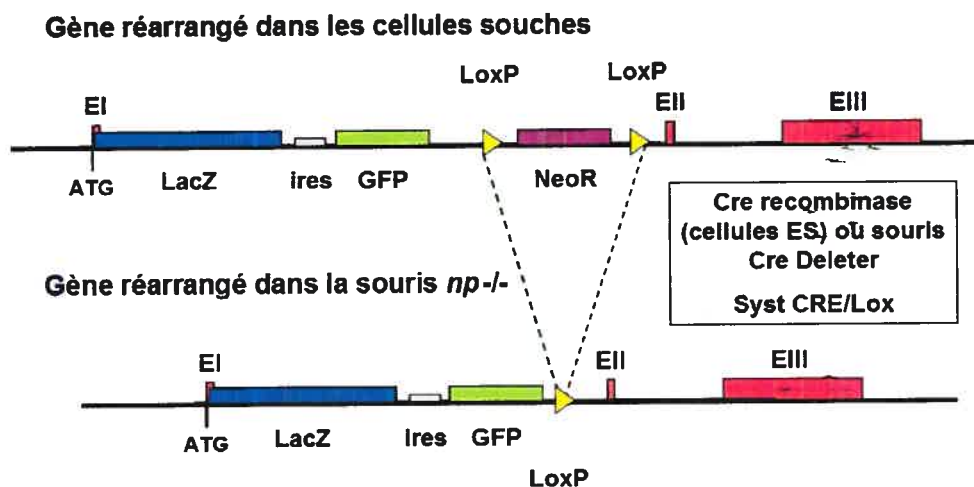
Cette cassette de recombinaison a été insérée dans un plasmide de type pET qui est un plasmide donnant peu de copies lors de l'amplification bactérienne. Cette propriété permet de limiter le nombre de réarrangements qui

peuvent avoir lieu pendant l'amplification du plasmide. Enfin, les sites de restriction utilisés pour la linéarisation du vecteur cible sont les sites *MunI* et *SgrAI* (Figure 25). Les enzymes sélectionnées pour linéariser le vecteur permettent d'éliminer l'ensemble du squelette du plasmide pET permettant d'obtenir un meilleur taux de recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires.



**Figure 25 : Carte du vecteur cible utilisé pour la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires.** Le vecteur utilisé (pET) est un vecteur à faibles copies limitant les recombinaisons lors de son amplification en bactérie. Les sites *MunI* et *SgrAI* correspondent aux sites de restriction servant à la linéarisation du vecteur cible. En bleu clair, sont indiquées les régions servant à la recombinaison dans les cellules souches embryonnaires.

La figure 26 représente les allèles réarrangés après recombinaison dans les cellules souches et après recombinaison avec le système Cre/loxP utilisé pour éliminer le gène de résistance à la néomycine.



**Figure 26 : Élimination du gène de sélection à la néomycine.** L'utilisation d'un vecteur codant pour la Cre recombinase permettra d'éliminer le gène de résistance à la néomycine *in vitro* avant l'injection dans les blastocystes. Une autre alternative sera d'utiliser une souris Cre délétère pour éliminer le gène de résistance à la néomycine *in vivo*.

## B. Vérifications de l'intégrité du vecteur

Le vecteur cible sera introduit dans les cellules souches embryonnaires par recombinaison homologue entre les bras d'homologie et transmis à travers la lignée germinale des souris chimériques. L'intégrité du vecteur doit donc être correcte pour éviter le transfert de mutations non désirées dans le gène cible. Le vecteur cible a été séquencé et de nombreuses digestions enzymatiques ont été réalisées nous permettant de vérifier le profil de restriction théorique. Les résultats de ces analyses nous ont révélé un réarrangement entre les sites LoxP, et une perturbation au niveau du bras court servant à la recombinaison. La cassette de sélection contenue entre les sites LoxP a été certainement éliminée au cours d'une amplification bactérienne. Concernant le bras court, des modifications du vecteur ont nécessité des étapes de recombinaison homologue dans les bactéries, et une mauvaise recombinaison est certainement à l'origine des réarrangements aberrants. L'élaboration du vecteur cible correct est encore en cours.

### **C. Perspectives**

L'élaboration d'une souris inactivée pour le gène de la neuropoïétine permettra d'étudier le profil d'expression de cette protéine dans le développement embryonnaire. L'incorporation de deux gènes rapporteurs permettra une étude détaillée des cellules dans lesquelles s'expriment la neuropoïétine. La  $\beta$ -galactosidase permettra de visualiser par microscopie les tissus exprimant la neuropoïétine. La eGFP permettra de sélectionner par cytométrie de flux les cellules exprimant la neuropoïétine.

Les souris transgéniques pourront être analysées à l'état homozygote pour étudier le rôle et la fonction de la neuropoïétine. Dans l'éventualité d'une létalité due à l'inactivation de la protéine, les souris pourront également être analysées à l'état hétérozygote pour étudier le profil d'expression de la neuropoïétine dans les tissus. Enfin, ces souris NP<sup>-/-</sup> pourront être croisées avec des souris CLC<sup>-/-</sup> et CNTF<sup>-/-</sup> pour étudier le rôle précis de ces cytokines.

## **Chapitre 6. Voies de signalisation empruntées par la neuropoïétine**

### **I. Introduction**

La neuropoïétine est une cytokine nouvellement identifiée appartenant à la famille de l'IL-6 (Derouet *et al*, 2004). La neuropoïétine recrute le même complexe récepteur que celui du CNTF et de CLC/CLF et permet la prolifération de modèles de précurseurs neuronaux (Derouet *et al*, 2004). Contrairement à CLC et CNTF, la neuropoïétine a un mode de sécrétion classique. Son profil d'expression est restreint au système nerveux central, et notamment dans les zones de développement des précurseurs neuronaux comme le neuroépithélium olfactif et rétinien. Cette cytokine, exprimée uniquement durant le développement embryonnaire de la souris, a également pu être identifiée dans plusieurs espèces dont le rat et le chimpanzé. Cependant, chez l'homme, le gène de la neuropoïétine se retrouve sous forme de pseudogène : une délétion de 8 nucléotides entraîne un décalage du cadre de lecture et une protéine non fonctionnelle (Derouet *et al*, 2004). Dans le but de mieux comprendre la fonction de cette protéine, nous avons étudié à l'aide de lignées cellulaires dérivées de neuroblastomes exprimant le récepteur au CNTF, les voies de signalisation activées par cette cytokine. Nous avons démontré, que cette cytokine permet l'activation des voies de signalisation JAK/STAT (plus particulièrement STAT1, STAT3 et STAT5), ainsi que la voie des MAP kinases et de la PI3K/Akt. Dans cette étude, nous n'observons pas de différence significative après activation de ces mêmes cellules par le CNTF. Cette cytokine entraîne également une augmentation importante de la synthèse d'un neuropeptide : le « vasoactive intestinal peptide » (VIP).

Les résultats obtenus dans cette étude renforcent la similarité fonctionnelle entre le CNTF et la neuropoïétine, dernier ligand identifié du récepteur tripartite au CNTF.

La contribution respective des auteurs dans ce travail est la suivante : Grimaud Linda a purifié la cytokine sur une colonne HisTrap; Laurence Preisser est la responsable de la plateforme de PCR en temps réel, elle forme les utilisateurs et supervise l'ensemble des expérimentations; Marie-Hélène Guilleux est la technicienne mettant au point et validant les couples de primers utilisés en PCR en temps réel; Sylvie Chevalier a supervisé l'ensemble de ce travail; Hugues Gascan et Jean-François Gauchat sont les directeurs des deux laboratoires qui ont collaboré pour ce travail. J'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans cet article sous la supervision et avec l'aide technique des différentes personnes citées précédemment.

Cet article a été soumis à la revue « The European Journal of Neuroscience ».

## **II. ARTICLE 2 : Signalling pathways recruited by neuropoietin, a newly identified CNTF receptor ligand.**

### **Signalling pathways recruited by neuropoietin, a newly identified CNTF receptor ligand.**

**Florence Guilhot<sup>1,2</sup>, Sylvie Chevalier<sup>2</sup>, Grimaud Linda<sup>2</sup>, Laurence Preisser<sup>2</sup>, Marie-Hélène Guilleux<sup>2</sup>, Jean-François Gauchat<sup>1</sup> and Hugues Gascan<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Département de pharmacologie, Faculté de médecine, INSERM U743, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Pavillon Roger Gaudry, Montréal (QC), H3T1J4, Canada

<sup>2</sup> INSERM U 564, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49033 Angers Cedex 01, France.

<sup>3</sup> Corresponding author: Hugues Gascan, INSERM U 564, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49033 Angers Cedex 01, France.

Phone: 33-2-41-35-47-31, fax: 33-2-41-73-16-30

E-mail : 

**Running title:** neuropoietin signalling



## **SUMMARY**

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is a cytokine supporting the differentiation and survival of a number of neural cell types. Its receptor complex consists of a ligand binding component, CNTFR $\alpha$ , associated with two signalling receptor components, gp130 and leukemia inhibitory factor receptor (LIFR). Striking phenotypic differences between CNTF- and CNTFR $\alpha$ -deficient mice suggest that CNTFR $\alpha$  serves as a receptor for a second developmentally important ligand. We recently demonstrated that neuropoietin displayed activities on cells expressing the tripartite CNTF receptor on their surface and constituted an alternative ligand for CNTF receptor. In this present study we examined in detail the different signalling pathways recruited by the neuropoietin in neuroblastoma derived cell lines. In contrast to that reported before for CNTF, soluble CNTFR failed to promote the action of neuropoietin, and an absolute requirement of the membrane form of CNTFR was required to generate a functional response to the cytokine. Results obtained showed an activation of Janus kinases (JAK1, JAK2, TYK2) leading to a tyrosine phosphorylation of the gp130 and LIFR. The phosphorylated signalling receptors served in turn as docking proteins for signal transducing molecules such as STAT3. *In vitro* analysis revealed the gp130-LIFR pathway also stimulated the PI3-kinase and the MAPK pathways. Moreover, neuropoietin induced expression of vasoactive intestinal peptide in SK-N-GP cell line. This study reinforces the functional similarity between CNTF and neuropoietin defining the new ligand for CNTFR.

## **KEYWORDS**

Neuropoietin, CNTF, cytokine, signalling pathway, VIP

## INTRODUCTION

The activation of gp130 signal transducing receptor molecule distinguishes a group of cytokines referred to as the interleukin (IL-) 6 family. This family involves 9 members: IL-6, IL-11, IL-27, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokine (CLC) and neuropoietin (NP). These cytokines have limited sequence homologies but share a four helix bundle structure (Bazan, 1991; Grotzinger *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2004). Depending on the activating ligand, gp130 can either homodimerize in the presence of IL-6 and IL-11 or associate with LIF receptor (LIFR), when recruited by LIF, OSM, CNTF, CT-1, CLC and NP. In addition to these shared signalling receptors subunits, the CNTF receptor (CNTFR) complex implicates a third specificity-determining binding component designed CNTFR $\alpha$ , which is anchored to the membrane through a glycosylphosphatidylinositol anchor (Davis *et al.*, 1991; Baumann *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1993a; Davis *et al.*, 1993b; Gearing *et al.*, 1994; Grotzinger, 2002). Association of CNTF to the CNTFR components subsequently leads to gp130-LIFR dimerization and activation event leads to the recruitment of Janus kinases (JAK1, JAK2, TYK2) (Lutticken *et al.*, 1994b; Narazaki *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994; Guschin *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 1995). Tyrosine phosphorylated gp130 and LIFR in turn serve as docking proteins for signal transducing molecules such as STAT3 and SHP-2 (Bonni *et al.*, 1993; Wegenka *et al.*, 1994; Boulton *et al.*, 1995; Lai *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). In vitro studies have also shown that the gp130-LIFR pathway can stimulate the PI3-kinase and the MAPK activity (Boulton *et al.*, 1994; Thoma *et al.*, 1994; Schiemann *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1998).

CNTF was characterized through its ability to sustain the survival of parasympathetic and motor neurons *in vitro* and *in vivo* (Stockli *et al.*, 1989; Arakawa *et al.*, 1990; Oppenheim *et al.*, 1991). CNTF can also attenuate the motor deficits found in different strains of mice with neuromuscular deficiencies (Sendtner *et al.*, 1992; Curtis *et al.*, 1993; Mitsumoto *et al.*, 1994; Linker *et al.*, 2002). Beside its activities on the nervous system, CNTF, which also displays trophic effects on denervated skeletal muscle, is a regulator of muscular strength

in aging, and can reduce body fat (Helgren *et al.*, 1994; Guillet *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 2001).

*Cntf*-deficient mice display only a mild loss of motor neurons leading to minor muscle weakness (Masu *et al.*, 1993). In addition, a null mutation in the human *cntf* gene does not lead to neurological deficits even at advanced ages (Takahashi *et al.*, 1994). In contrast, the CNTFR $\alpha$  subunit is essential for the survival of nearly half of all motor neurons during development, and mice harboring a homozygous *cntfr* $\alpha^{-/-}$  mutation die shortly after birth (DeChiara *et al.*, 1995). These dramatic viability differences indicate that CNTFR $\alpha$  plays a critical role during development at a period when CNTF is almost absent and suggest the existence of one or more developmentally important ligand(s) (DeChiara *et al.*, 1995).

We previously established that CLC, in association with either soluble CLF receptor (Elson *et al.*, 2000), or with a soluble form of CNTFR $\alpha$  (Plun-Favreau *et al.*, 2001), generates soluble composite cytokines that also bind and activate the CNTFR complex (Elson *et al.*, 2000; Lelievre *et al.*, 2001; Plun-Favreau *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2006). Recently, we have characterized a third ligand for the tripartite CNTFR complex, we named neuropoietin (NP) (Derouet *et al.*, 2004). NP is only expressed during embryonic life when CNTF and CLC are absent, or barely detectable, postulating for an important role of NP in nervous system development. Moreover, NP can sustain motor neuron survival and could increase neurosphere proliferation *in vitro* (Derouet *et al.*, 2004). In this present study we examined the signalling pathways recruited by the NP in cell lines of neural origin. This study provides new information about the intracellular signalling mechanisms by which NP activates neuropeptide gene transcription.

## MATERIAL AND METHODS

### *Cells and Reagents*

SK-SY5Y and SK-N-GP neuroblastoma cell lines (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were routinely grown in RPMI culture medium supplemented with 10% fetal calf serum. CNTF and IL-4 were purchased from R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). The 4G10 anti-phosphotyrosine mAb was bought from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA). Polyclonal antibodies raised against STAT3, STAT1, JAK1, JAK2, TYK2, p85 (PI3-kinase) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The specific mAb for phospho-705-STAT3, phospho-701-STAT1, STAT5 and phospho-694-STAT5, the antibodies detecting total and phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204), antibodies against phospho-AKT (Ser473) and AKT were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Monoclonal antibodies: AN-HH1 (anti-gp130); AN-B2 (anti-CNTFR $\alpha$ ); AN-E1 (anti-LIFR $\beta$ ) and LIF were produced in the laboratory as described (Elson *et al.*, 2000; Plun-Favreau *et al.*, 2001). The neutralizing monoclonal antibody anti-gp130 (clone BP-8) was purchased from Diaclone (Besançon, France). Goat anti-mouse and anti-rabbit peroxidase labeled immunoglobulins were from Biosource (CA, USA).

### *Flow cytometry analysis*

For the detection of the tripartite CNTF receptor, SK-N-GP and SY-SY5Y were incubated for 30 min at 4°C with 10  $\mu$ g/ml with anti-CNTFR $\alpha$ , anti-LIFR $\beta$ , anti-gp130 monoclonal antibodies or an isotype control, before using the phycoerythrin-conjugated anti-mouse antibody as secondary antibody. Fluorescence was analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

### *Neuropoietin Purification*

HEK 293 cell line was stably transfected with a plasmid (pcDNA3.1/D TOPO V5-His) containing the cDNA encoding the neuropoietin, using Exgen reagent (Euromedex, Souffleweyersheim, France). For NP production, the stably

transfected HEK cells were grown in RPMI culture medium supplemented with 10% fetal calf serum until confluence, then cells were maintained in Yssel medium (Yssel *et al.*, 1984) supplemented with 100 nM phorbol myristate acetate during 72h culture period. NP tagged with a 6His-Tag, was affinity purified using HisTrap column beads (GE Healthcare), from culture supernatant. Eluted fractions were next submitted to SDS-PAGE silver staining to evaluate their concentrations. Positive fractions were dialyzed against PBS and sterile filtered before use.

### *Tyrosine Phosphorylation, Immunoprecipitation and Western Blot Analysis*

After a 24-h serum starvation, the cells were stimulated for 10 min in the presence of the indicated cytokine. The cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 50 mM DTT, 0.1 % bromophenol blue), sonicated and then submitted to SDS-PAGE gel electrophoresis and transferred onto an Immobilon-P transfer membrane (Millipore). The membranes were subsequently incubated with the indicated primary antibody overnight before being incubated with the appropriate secondary antibody labeled with horseradish peroxidase for 60 min. The reaction was visualized using ECL reagent on an image Master camera from Amersham (Uppsala, Sweden). In some experiments, the membranes were stripped overnight in 0.1 M glycine-HCl pH 2.7, and neutralized in 1 M Tris-HCl pH 7.6, before reblotting. For immunoprecipitation experiments, the cells were lysed in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, proteinase inhibitors (1 mg/ml pepstatin, 2 mg/ml leupeptin, 5 mg/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), and 1% Nonidet P-40 (Robledo *et al.*, 1997). After lysis and centrifugation to pellet insoluble material, the supernatants were immunoprecipitated overnight at 4°C with 5 µg of appropriate antibody. Then, the complexes were isolated using beads coupled to Protein A, washed and treated as described above. For neutralizing experiments, cells were first pre-incubated with 25 µg/ml antibody before being activated with 5 ng/ml cytokine for 10 min, and subsequently analyzed as above.

### *Real time PCR*

After a starvation step, cells were activated with appropriate cytokine during indicated time. RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The RNA was reversed transcribed into cDNA using random hexamers primers and Superscript II reverse transcriptase reagents (Invitrogen). Primers for the genes of interest were designed using primer design software Primer3 and optimized for use. Sequences are available upon request. All PCR assays were performed in duplicate with 50 ng of cDNA using a Chromo4™ System (Biorad). Thermal cycling was initiated with an incubation of 95°C for 3 min to activate the polymerase, then 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s and 72°C for 15s. GAPDH was used as a loading control for each sample. The  $\Delta C_t$  method was used for quantification. GAPDH, HPRT1 and HSPCB were used as housekeeping genes against which all samples were multiple normalized (Vandesompele *et al.*, 2002).

## RESULTS

### *Recruitment of Janus Kinases by NP*

We previously reported the requirement of an expression of three CNTF receptor subunits, e.g. CNTFR, gp130, LIFR, on the cell membrane to observe a functional response to NP. In the present study we dissected the NP signalling properties using two neuroblastoma cell lines, as models. SK-NGP and SK-SY-5Y neuroblastoma cells expressed on their surface the three subunits defining the NP functional receptor as detected by flow cytometry (Figure 1). Receptor activation can lead to an activation of Jak1, Jak2 and Tyk2 (Derouet *et al.*, 2004) but no recruitment of Jak3 could be evidenced (data not shown).

### *NP activates tyrosine phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5*

Downstream signalling events were further analyzed by studying the activation level of STAT proteins in response to NP. As shown in figure 2, SK-NGP and SK-SY5Y stimulation with either, LIF, CNTF or NP elicited to an activation of STAT3 and to a weaker extent STAT1 in a dose-dependant manner (Figure 2). NP activated phosphorylation of STAT3, with a maximal activation observed for a 1 nM NP concentration (or 25 ng/ml). To a weaker extend, STAT5 phosphorylation was observed in SK-N-GP after NP stimulation (Figure 2A). Kinetic analysis of STAT3 activation shows that a signal is already detectable after a 2-min contact with NP, that peaked at 20-min prior start decreasing after a 60-min incubation (Figure 3A). Obtained results were in agreement with the reported time course of receptor activation by CNTF (Kaur *et al.*, 2002). The involvement of gp130 signalling subunits in NP-induced STAT3 activation was reinforced by studying the inhibition of STAT3 phosphorylation after addition of anti-gp130 neutralizing antibodies in the cell cultures (Figure 3B). We previously reported the ability of AN-HH1 type antibody to neutralize gp130 cell signalling mediated by all the IL-6 family members, by acting on receptor dimerization, but not on ligand binding. Accordingly, AN-HH1 inhibited the gp130 recruitment in response to three ligands: LIF, CNTF and NP. In contrast, B-P8 mAb recognized a functional epitope specifically engaged in the activation of gp130 signalling receptor by CNTF (Chevalier 1997). Similarly to that observed for

CNTF, B-P8 mAb neutralized the NP response but not LIF signalling, indicating that both, CNTF and NP, share a same functional epitope to recruit gp130 receptor.

#### *Involvement of AKT and MAP kinase pathway in NP signalling*

We then investigated the role of two pathways implicated in the signalling of the IL-6 family of cytokines, namely PI-3 kinase/Akt and MAP kinase pathways (Heinrich *et al.*, 1998; Heinrich *et al.*, 2003). We first studied the role of PI-3 kinase/Akt pathway by measuring the tyrosine phosphorylation level of Akt in the two neuroblastoma cell lines by western blotting experiments (Figure 4A and B). Cells were treated with different concentrations of NP for 10 min. Western blot protein extract analysis revealed a marked increase in the level of phospho-Akt compared with untreated cultures, with a plateau value reached for a NP concentration of 1 nM. This result establishes that the PI-3 kinase/Akt pathway played an important role in mediating NP signalling.

ERK1 and ERK2, involved in the MAP kinase pathway have been shown to play important roles in mediating the mitogenic effects of the IL-6 family members. To determine whether NP activates MAP kinase signalling as well, the neuroblastoma cells were grown overnight in defined medium and then treated with increasing concentrations of NP. ERK1 and ERK2 activation was determined by measuring their tyrosine phosphorylation levels. Stimulation of the neuroblastoma cells with NP increased basal values (Figure 4A and B). A maximum activation level was observed for a 2 nM range of NP (50 ng/mL) in both tested cell lines. These results demonstrate involvement of the MAP kinase signalling pathway in functional responses to NP.

#### *SOCS3 is implicated in the negative feedback of JAK-STAT signalling pathway*

Proteins of the SOCS family are potent inhibitor of the JAK/STAT signalling cascade, negatively regulating signal transduction of a variety of cytokines, including gp130 pathway cytokines. Measurements of SOCS expression in SK-N-GP cells activated with NP or CNTF was carried out by quantitative RT-PCR. Obtained results showed a significant induction of SOCS3 after a 24h treatment with either cytokine (Figure 5). Following stimulation with



NP, SOCS3 was induced 300-fold above untreated control. In contrast, the remaining SOCS family members did not modulate their expression level after a NP, or CNTF, cell contact.

*NP increases the mRNA expression of TRKA in neuroblastoma cell lines.*

To study the possibility for NP to act synergically with additional growth factor(s), we first looked for an induction of tyrosine kinase receptors in response to the cytokine. Determination of 18 different tyrosine kinase receptor expressions was carried out by quantitative RT-PCR. SK-N-GP cells were exposed for 24h to 1 nM NP or to 0.5 nM CNTF, and transcript levels encoding tyrosine kinase receptors were measured (Figure 6). An absence of expression was noted for c-fms, ron, flt-3, flt-4 and tie-1. The 13 remaining receptors were present in the studied cell line, and a 2.5 and 3.5-fold TrkA RNA induction was observed with NP and CNTF respectively. For the other genes, no or only slight variations in their expression were observed.

*NP induces mRNA expression of VIP.*

CNTF is known to alter the expression of several neuropeptides; it increases vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin and substance P and decreases neuropeptide Y (NPY) (Rao *et al.*, 1992). We tested the possibility for NP, acting through CNTF receptor complex, to regulate different neuropeptide expressions in SK-N-GP cells. Cells were first tested by real time PCR for expression of VIP, NPY, tyrosine hydroxylase, galanin and somatostatin. All these genes were detected in SK-N-GP cells with exception of somatostatin (Figure 7A). Analysis of transcript induction of these genes expressed in SK-N-GP was done after 24h of NP treatment compared with untreated cells (Figure 7B). As it was shown, a 300-fold increased expression of VIP neuropeptide was observed in the neuroblastoma. A minor induction was obtained for the catecholamine biosynthetic enzyme tyrosine hydroxylase (TH) with an increase of 2.9-fold. However, no variation in NPY and galanin transcripts was observed in the studied cells, in response to NP or CNTF (Figure 7B).

As VIP was the more induced gene by NP, we next compared the ability of NP and CNTF to increase the transcript of this neuropeptide. Although, the SK-N-GP cells

were exposed for 5 or 24h to NP (50 ng/mL) or to CNTF (20 ng/mL), and the cellular content of VIP mRNA was analyzed (Figure 8A). The mRNA was increased 300-fold after 24h of NP contact compared with untreated cells, whereas an increase of 150-fold was observed with CNTF. NP seems to be more effective than CNTF on the activation of VIP. A time course of VIP mRNA induction was done on this cell line with NP. The increased of VIP mRNA reached a maximum after 24 h of contact (Figure 8B) and for a concentration of 2nM of NP (Figure 8C).

## DISCUSSION

Neuropoietin gene was identified by structural profile-based computational screen of mouse genome (Derouet *et al.*, 2004). It acts through a membrane receptor complex comprising CNTF receptor- $\alpha$  component, gp130 and LIFR, and together with CLC/CLF composite cytokine and CNTF, NP represents a third ligand for this receptor complex. Neuropoietin is highly expressed during development in neuroepithelia and is also observed in retina and skeletal muscle at the same stage.

Because of the difficulty to obtain large amounts of primary cultures of embryonic neurons to perform signalling studies, the experiments were carried out using neuroblastoma derived cell lines. In the present study, we have analyzed the cell signalling mechanisms observed in response to the NP and compared the recruited pathways with those activated by CNTF. Our analysis demonstrates a large overlap between the pathways activated by NP and CNTF.

Gp130 signalling receptor is involved in the formation of receptor complexes of ten different cytokines (Heinrich *et al.*, 2003). Some of them, such as OSM, can directly bind gp130, whereas others will induce dimerization of gp130 with related cytokine receptors (Hibi *et al.*, 1990; Gearing *et al.*, 1992). These processes occur through the recognition of different contact points, or sites, expressed at the receptor surface. Some of these contact points are cytokine specific, and will not be recruited by a neighboring cytokine (Olivier *et al.*, 2000; Grotzinger, 2002; Boulanger *et al.*, 2003a; Boulanger *et al.*, 2003b; Plun-Favreau *et al.*, 2003). We previously showed that CNTF functional activity, but not LIF, cardiotrophin-1 or OSM responses, could specifically be neutralized by B-P8 monoclonal antibody directed against gp130 (Chevalier *et al.*, 1996). In the present work, we have shown that the same antibody also blocked the NP response indicating that both CNTF and NP recognized gp130 through a shared epitope.

In neuroblastoma cells, NP triggered gp130-LIFR recruitment and tyrosine phosphorylation induced by JAK tyrosine kinases. As reported for related ligands, an activation of JAK1, JAK2 and TYK2 was observed in response to NP activation (Lutticken *et al.*, 1994a; Narazaki *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994; Guschin *et al.*,

1995; Stahl *et al.*, 1995). According to the respective phenotypes demonstrated in JAK kinase deficient mice (Thomis *et al.*, 1995; Parganas *et al.*, 1998; Karaghiosoff *et al.*, 2000), we can hypothesize a prevalent involvement of JAK1 in gp130-LIFR signalling in response to NP and CNTF (Rodig *et al.*, 1998). Additionally, in *Jak1*<sup>-/-</sup> mice, neurons are unable to respond to the ligands of the gp130 receptor family and die by apoptosis, whereas neuronal development was not affected in mice lacking JAK2, JAK3 or TYK2 (Thomis *et al.*, 1995; Parganas *et al.*, 1998; Karaghiosoff *et al.*, 2000).

Following NP cell activation and JAK activation, information is relayed to the nucleus by different signalling molecules, including the STAT1, STAT3, STAT5 transcriptional activators, which are quickly recruited by this novel CNTFR ligand. Some differences were observed in the tyrosine phosphorylation levels of the STAT proteins in response to NP. An induction of phosphorylated STAT3 was observed for a 5- and 10- fold lower NP concentration compared to phospho-STAT1 and phospho-STAT5 respectively. These results are in agreement with an usual stronger phospho-STAT3 recruitment observed in response to the gp130 signalling cytokines (Stahl *et al.*, 1994). STAT3 is essential for the early development of the mouse embryo (Takeda *et al.*, 1997). Embryos developed until E6 before a rapid degeneration with no obvious mesoderm formation. Involvement of STAT3 in CNTF signalling was demonstrated initially using neuroblastoma cell lines or receptor reconstituted systems expressed in fibroblast cell lines (Bonni *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1995). Since, their functional responses to CNTF have been detected in cells of glial origin (Bonni *et al.*, 1997; Kahn *et al.*, 1997). The present work led to related conclusions by demonstrating that STAT3 is also a major signalling protein for the NP. The effect of the cytokine on cells of glial origin remains to be established. We also detect to a lesser level, a STAT1 and STAT5 activation in NP signal transduction. STAT1 gene inactivation in the mouse has underlined its essential involvement in mediating the antiviral properties of interferons, although no evidence was found for an alteration of the responses mediated through the gp130 pathway in these mice (Meraz *et al.*, 1996). Absence of STAT5 results in severe combined immunodeficiency in mice (Yao *et al.*, 2006), but not in a nervous system deficiency, suggesting that this latter pathway is not a major signalling pathway for the NP response.

A robust recruitment of the PI3-kinase/AKT pathway was also observed in response to NP and to CNTF. AKT recruitment was dose dependent and reached a plateau value for a 25 ng/ml of NP, similar to that observed for the STAT3 induction. PI3-kinase has previously been reported to act upstream of MAP kinase activation when the gp130/LIFR complex bound LIF (Oh *et al.*, 1998). In the present study, we also observed a strong induction of ERK1 and ERK2 tyrosine phosphorylation following cellular activation by NP.

STAT, AKT and MAPK pathway activation were transient pointing towards the existence of a negative regulatory loop for NP response. This points out a mechanism for NP desensitization process, possibly involving the inhibition of JAK activity through SOCS. SOCS are a family of negative regulatory proteins induced by cytokine signals (Yoshimura *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997; Yoshimura, 2005). They modulate signalling by several mechanisms, which include inactivation of the Janus Kinase (JAKs), blocking access of the STATs to receptor binding sites, and ubiquitination of signalling proteins and their subsequent targeting to the proteasome (Yoshimura, 2005). SOCS1 and SOCS3 are known to inhibit response to a number of cytokines (Nicholson *et al.*, 1999). We found that SOCS3 expression was strongly induced by NP and CNTF, whereas transcription of related SOCS members remained unchanged, reinforcing the idea of a similar regulation mode for both mediators.

We tested the possibility for NP to act synergically with tyrosine kinase receptor pathways. We demonstrate that among a series of 18 tested receptors, NP only increased the expression of TrkA, opening the possibility for collaboration between NGF, the TrkA ligand, and NP pathways. Interestingly, a related observation was also reported and shown a TrkA up-regulation in a neuroblastoma cell line treated with CNTF (Bogenmann *et al.*, 1998). Other studies also evidenced a synergistic effect on survival and neurite outgrowth of motor and sensory neurons in response to a NGF/CNTF association (Thaler *et al.*, 1994; Oyesiku & Wigston, 1996). We can hypothesize that a similar synergy should occur between NP and neutrophins during neural development.

CNTF is a potent modulator of neuropeptides and neurotransmitter synthetic enzyme gene expression in sympathetic neurons (Symes *et al.*, 1993). A real time RT-PCR analysis revealed an endogenous expression of VIP, tyrosine hydroxylase, galanin and NPY in the SK-N-GP cell line, giving an opportunity for a first approach of NP regulatory properties on these mediators. Some of these regulators previously reported as modulated by CNTF, remained unchanged after treating the studied cell line with either CNTF or NP (NPY, somatostatin, galanin) (Symes *et al.*, 1993). SK-N-GP may lack part of the transcriptional machinery for the genes encoding these peptides. Interestingly a strong induction of VIP was observed in the presence of NP. Changes in the level of VIP mRNA are detectable 1h after NP application, and the transcripts continue to increase for 24h. The regulation of VIP gene transcription by NP in the SK-N-GP neuroblastoma cell line provides the opportunity to investigate mechanisms through which NP could influence the determination of sympathetic neuron phenotype.

In conclusion, we show in neuroblastoma cell lines, that NP is able to recruit the STAT, PI3-kinase, MAP kinase and SOCS pathways. This study reinforces the functional similarity between NP and CNTF defining, beside CLC/CLF composite cytokine, a third ligand for CNTFR $\alpha$  (Elson *et al.*, 2000; Derouet *et al.*, 2004). Additional studies on primary cultures of rodent neurons should bring complementary information in the understanding of NP biology. Similarly, NP gene inactivation, as well as the successive knock-out of three CNTFR $\alpha$  ligands will give major informations on this pathway in neural development.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Neuroblastoma cell lines expressed the three chains of CNTF receptor.**

The SK-N-GP and SK-SY-5Y neuroblastoma cell lines were incubated either with 100ng of IgG control antibody, anti-CNTFR $\alpha$ , anti-LIFR $\beta$  or anti-gp130 for 30 min. Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

### **Figure 2: NP induces tyrosine phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5 transducing proteins.**

SK-N-GP (A.) and SK-SY-5Y (B.) cells were incubated either with or without 25 ng/mL of IL-4 and LIF, or 10 ng/ml of CNTF, or indicated concentrations of NP for 10 min. After lysis in sample buffer, proteins were analyzed in SDS-PAGE western blotting using a monoclonal anti phospho-STAT3 antibody (P-STAT3), or a monoclonal anti phospho-STAT1 antibody (P-STAT1), or a monoclonal anti phospho-STAT5 antibody (P-STAT5) as indicated. The blots were stripped and reprobed with a polyclonal antibody recognizing activated and non activated proteins.

### **Figure 3: A functional membrane CNTFR expression is required to induce the STAT3 pathway activation in response to NP**

**A.** SK-N-GP cells were activated with 50 ng/mL of NP for 2-120 min. After lysis, the lysates were subjected to immunoblot analysis using a monoclonal anti phospho-STAT3 antibody (P-STAT3). The blots were stripped and reprobed with a polyclonal antibody recognizing activated and non activated STAT3.

**B.** AN-HH1 is a specific gp130 neutralizing antibody; B-P8 antibody inhibits specifically the CNTF activity. Cytokines (5ng/ml for NP and LIF; 1ng/ml for CNTF) were incubated with indicated antibodies (50 $\mu$ g/mL) for 1h at 37°C. SK-N-GP cells were incubated either with or without antibodies and cytokines for 10 min. After lysis in sample buffer, proteins were analyzed in SDS-PAGE western blotting using a monoclonal anti phospho-STAT3 antibody (P-STAT3). The blots were stripped and reprobed with a polyclonal antibody recognizing activated and non activated STAT3 proteins.

**Figure 4: NP activated PI3-kinase/AKT and MAP Kinase (ERK1/ERK2) pathways**

SK-N-GP (A.) and SK-SY5Y (B.) cells were incubated either with or without 25 ng/mL of IL-4 and LIF, or 10 ng/ml of CNTF, or indicated concentrations of NP for 10 min. After lysis in sample buffer, proteins were analyzed in SDS-PAGE western blotting using a monoclonal anti phospho-Akt antibody (P-Akt), or with antibodies specific for activated ERK1 and ERK2. The blots were stripped and reprobed with a polyclonal antibody recognizing activated and non activated proteins.

**Figure 5: Expression of SOCS3 is activated in response to NP induction.**

The gene expression of SOCS family was analyzed by real time PCR. SK-N-GP cells were stimulated without cytokine or with 50 ng/ml of NP or with 20 ng/ml of CNTF for 24h. Total RNA were extracted before being reverse transcribed. Each sample was made in duplicate and normalized with 3 house keeping genes (GAPDH, HPRT1 and HSPCB). Results show the induction factor obtained in comparing the expression in non stimulated cells and in stimulated cells. N.D.: Not determined.

**Figure 6: Expression profiles of tyrosine receptors in neuroblastoma SK-N-GP cell lines**

The cellular content of different tyrosine receptor cDNA was analyzed by real time PCR. SK-N-GP cells were stimulated without cytokine or with 50ng/ml of NP or with 20 ng/ml of CNTF for 24h. Total RNA were extracted before being reverse transcribed. Each sample was made in duplicate and normalized with 3 house keeping genes (GAPDH, HPRT1 and HSPCB). Results show the induction factor obtained in comparing the expression in non stimulated cells and in stimulated cells. n.e.: not expressed.

**Figure 7 : Neuropeptide expression in SK-N-GP cell line.**

The expression of neuropeptides (Tyrosine Hydroxylase (TH), neuropeptide Y (NPY), VIP, Galanin,) was analyzed by real time PCR. SK-N-GP cells were stimulated with or without neuropoietin for 24h. Total RNA were extracted before



being reverse transcribed. Each sample was made in duplicate and normalized with 3 house keeping genes (GAPDH, HPRT1 and HSPCB). Results show the normalized quantities (**A.**) and the induction factor (**B.**) obtained in comparing the expression in non stimulated cells and in stimulated cells. **A.** SK-N-GP expressed a high level of Galanin. In a lesser extent, SK-N-GP expressed VIP and NPY transcripts. TH was slightly expressed. Somatostatin was not expressed. Results were the mean of three different experiments. **B.** VIP is highly induced after a 24h NP activation.

**Figure 8: NP induced the expression of VIP in neuroblastoma cell lines**

The expression of VIP was analyzed by real time PCR. SK-N-GP cells were stimulated with or without cytokine for indicated times. Total RNA were extracted before being reverse transcribed. Each sample was made in duplicate and normalized with 3 house keeping genes (GAPDH, HPRT1 and HSPCB). Results show the induction factor obtained in comparing the expression in non stimulated cells and in stimulated cells. **A.** NP induced an increase of VIP expression in SK-N-GP after 24h of treatment. Results were the mean of three different experiments. **B.** Kinetic analysis of VIP expression induction was realized on SK-N-GP at indicated times, with a maximum induction after 24h treatment. **C.** NP induced a VIP expression in a dose dependant manner.

**Acknowledgements:**

We thank Josy Froger for providing neutralizing antibodies. F.G. was funded by a grant from the Canadian Institute of Health Research (MOP-57832). This work was supported by Association Française contre les Myopathies (Grant 9884), and a grant from Post Genome Program of the Contrat Etat Region. J.-F. G. is a Canada Research chair recipient.

Figure 1

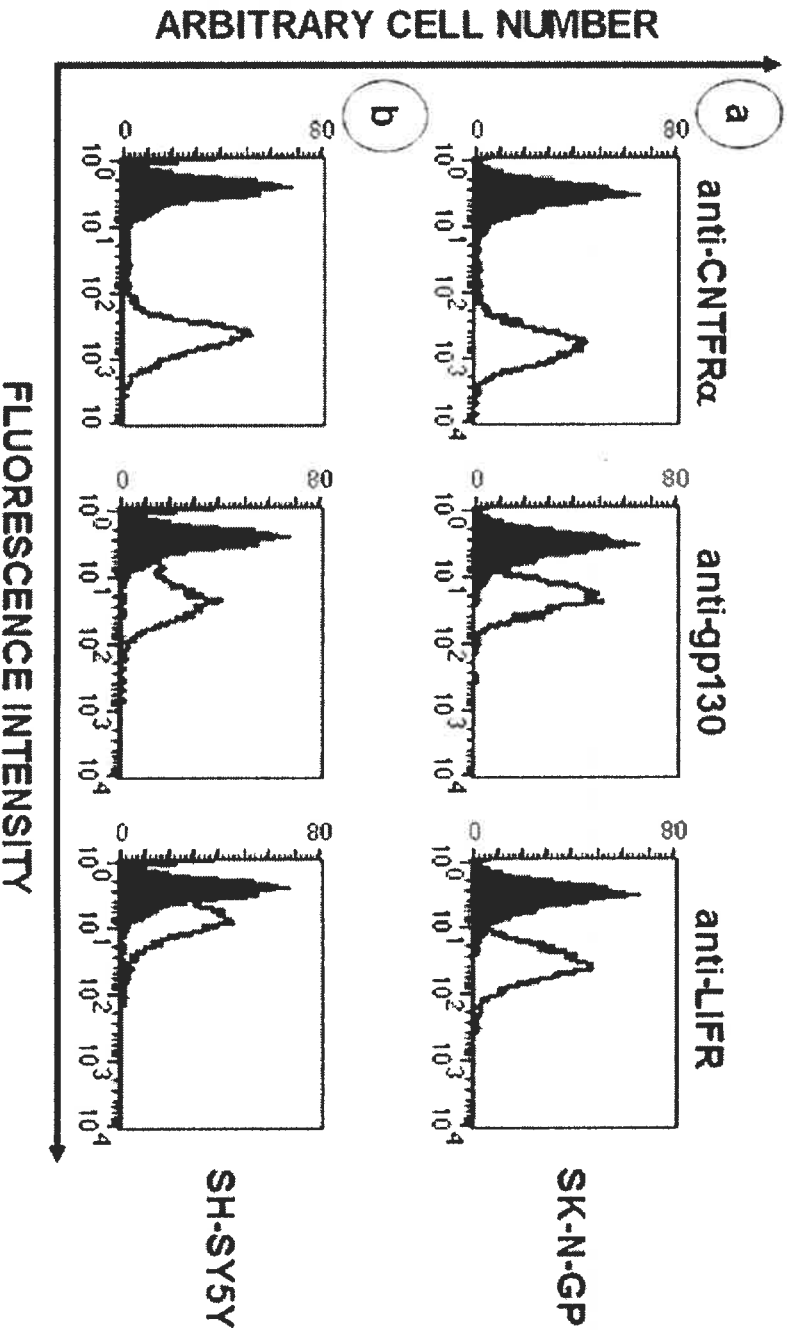
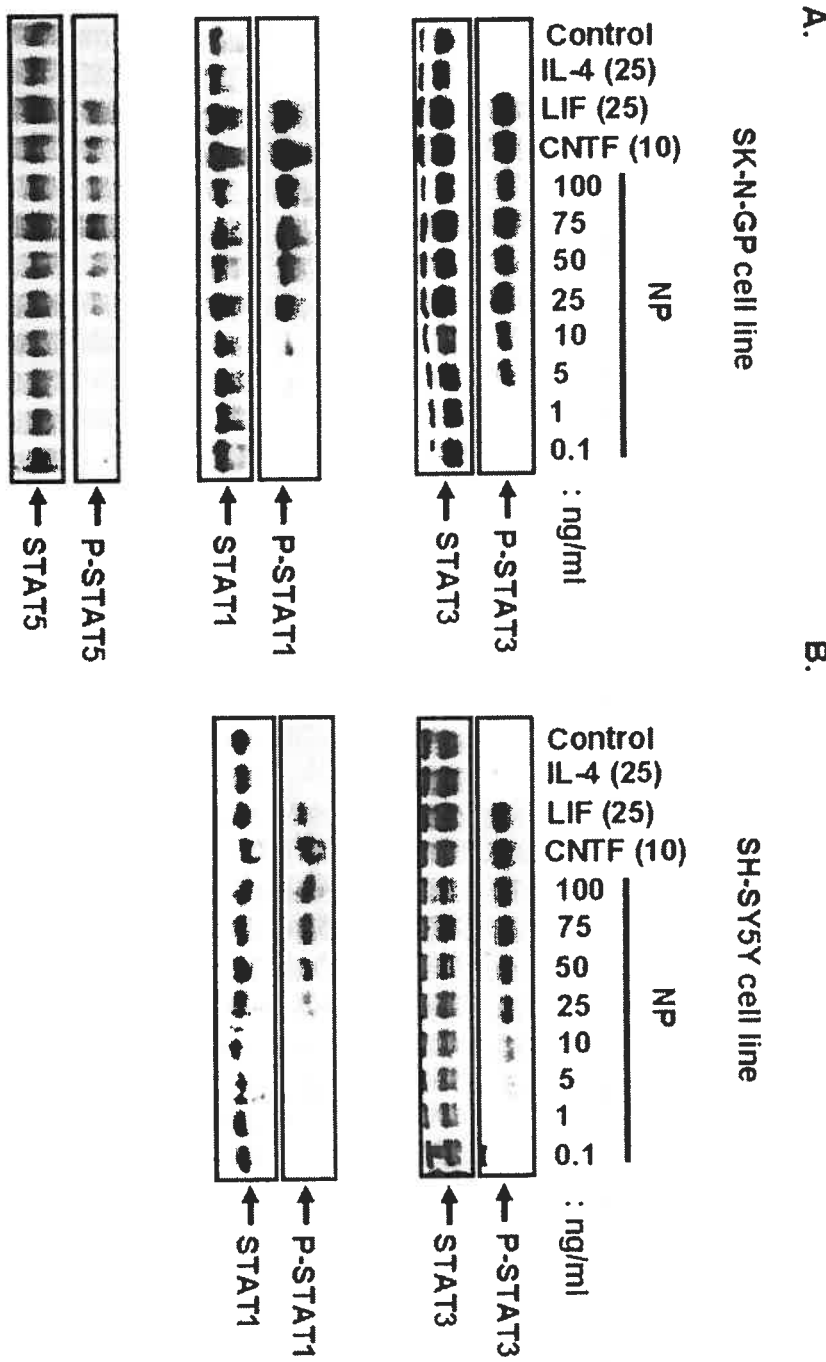
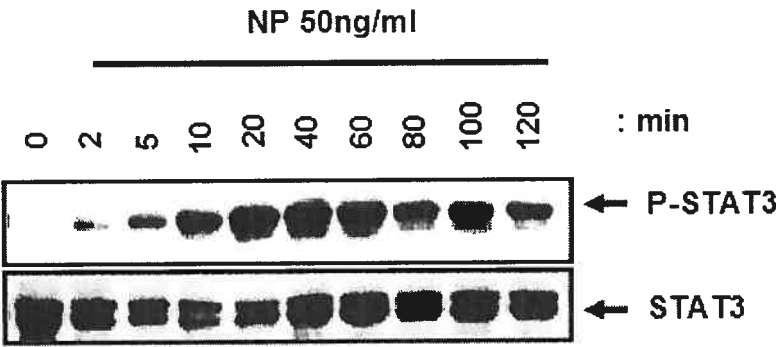


Figure 2



**Figure 3**

**A.**



**B.**

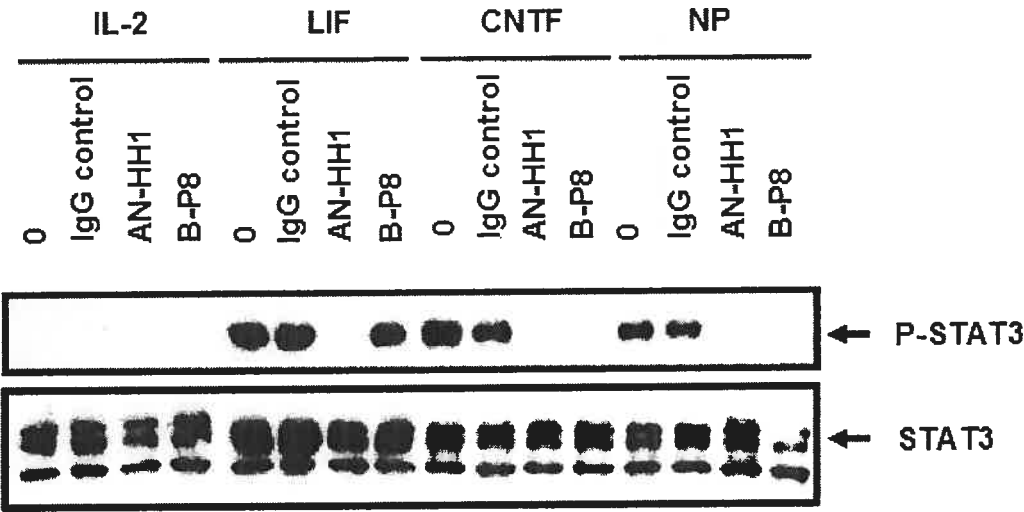
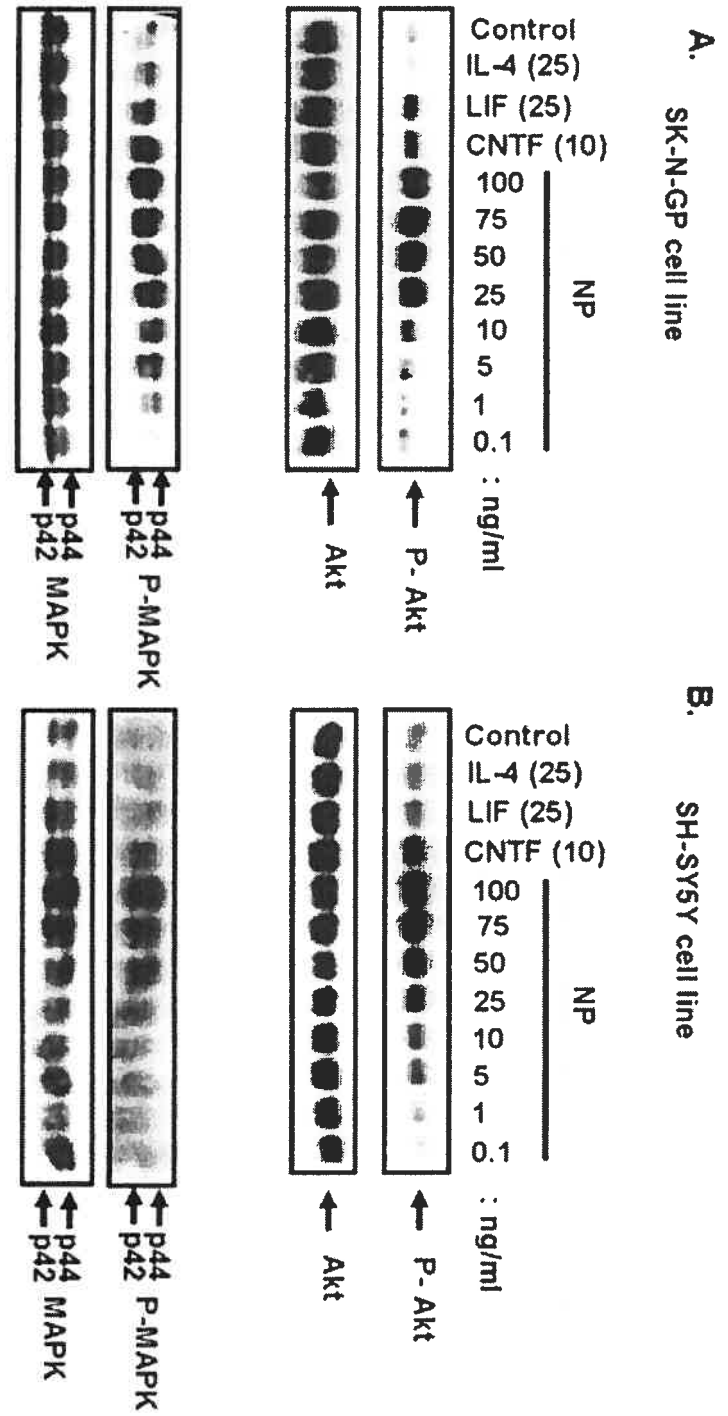
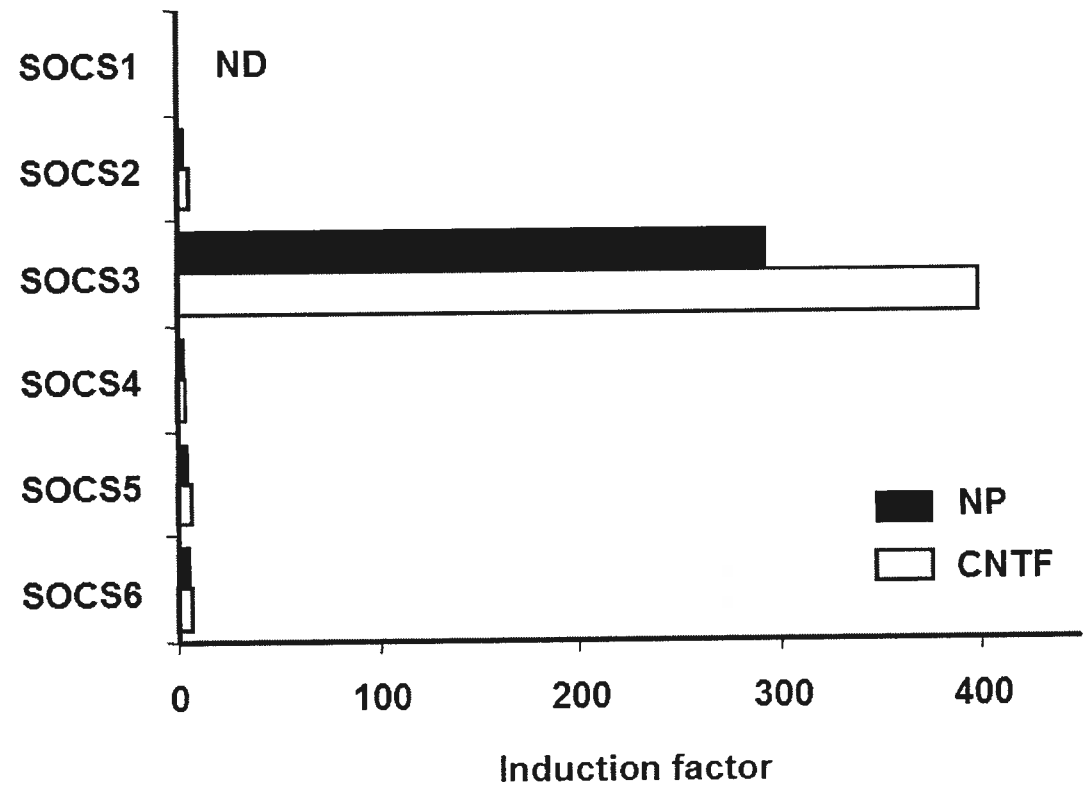


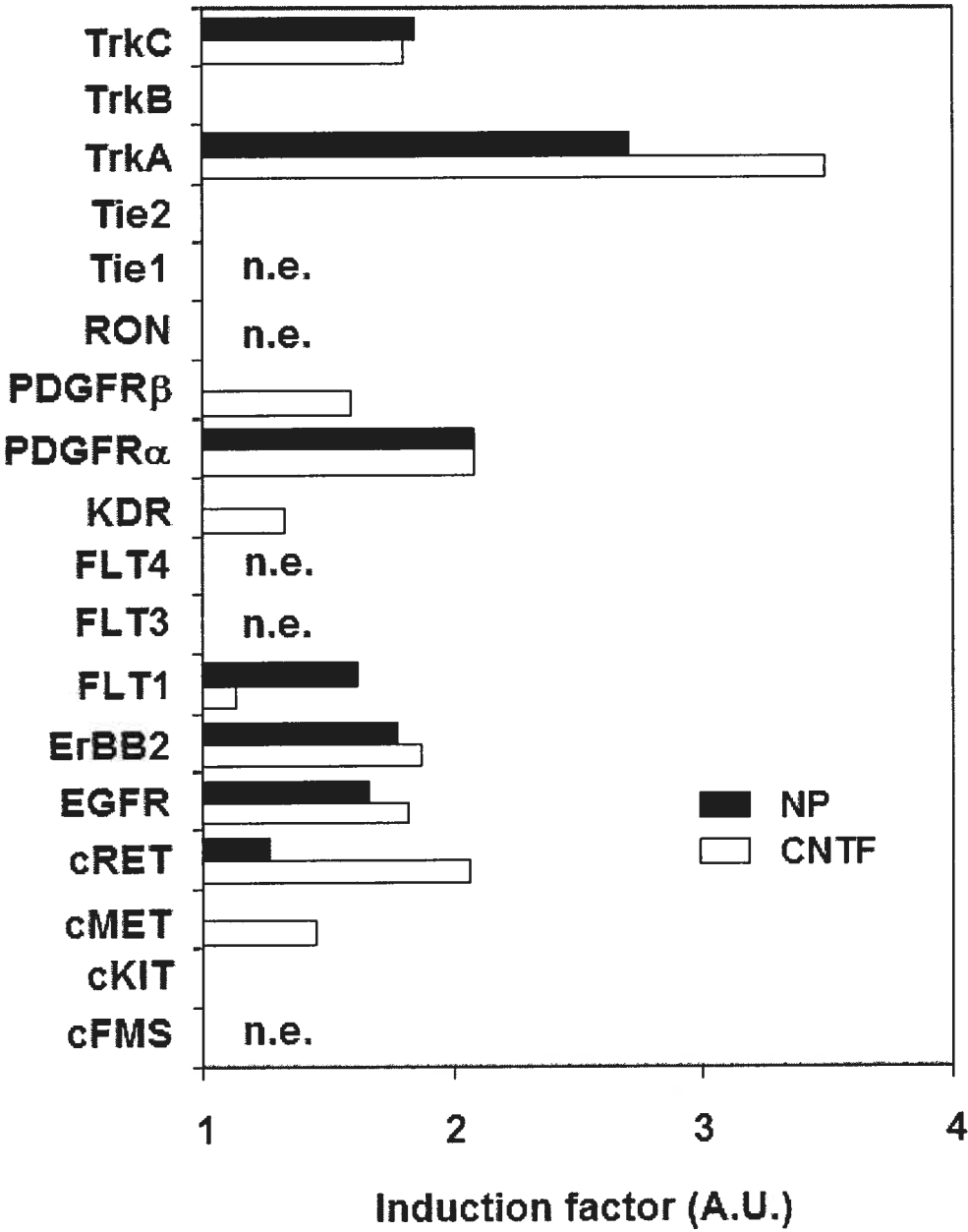
Figure 4



**Figure 5**



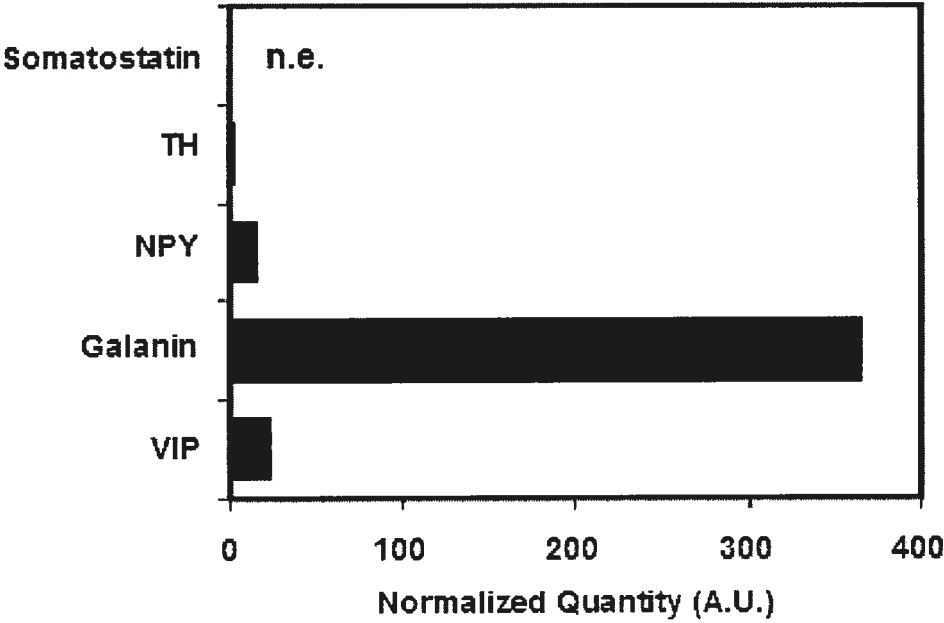
**Figure 6**



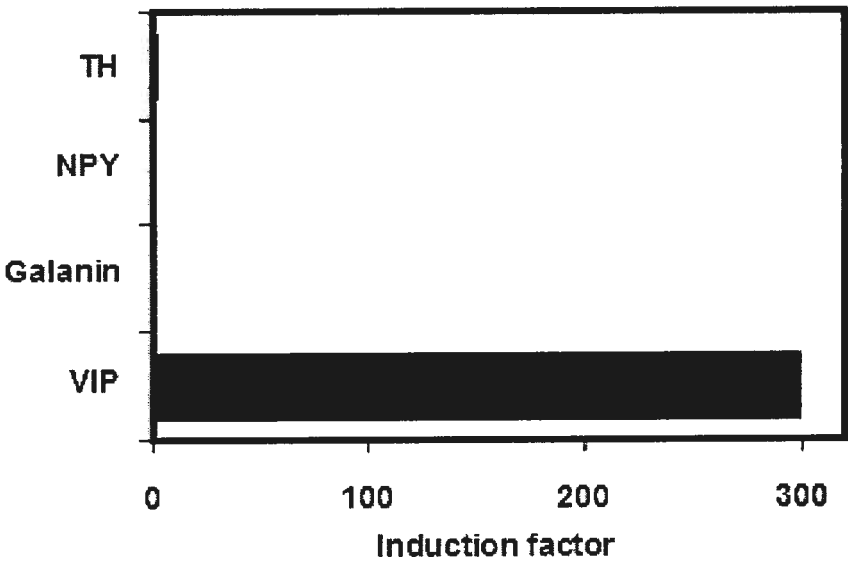


**Figure 7**

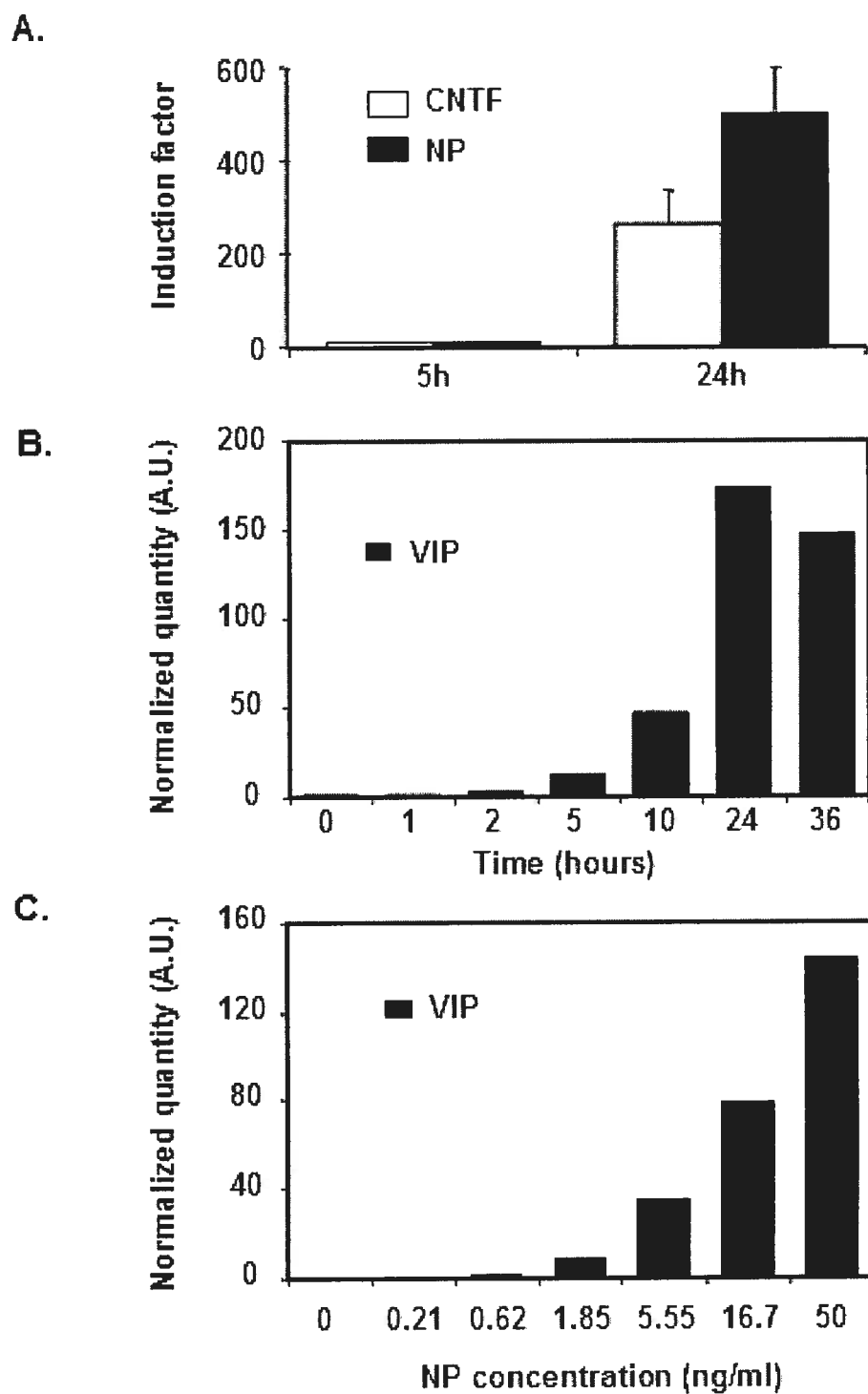
**A.**



**B.**



**Figure 8**



## REFERENCES

- Arakawa, Y., Sendtner, M. & Thoenen, H. (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci*, **10**, 3507-3515.
- Baumann, H., Ziegler, S.F., Mosley, B., Morella, K.K., Pajovic, S. & Gearing, D.P. (1993) Reconstitution of the response to leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in hepatoma cells. *J Biol Chem*, **268**, 8414-8417.
- Bazan, J.F. (1991) Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron*, **7**, 197-208.
- Bogenmann, E., Peterson, S., Maekawa, K. & Matsushima, H. (1998) Regulation of NGF responsiveness in human neuroblastoma. *Oncogene*, **17**, 2367-2376.
- Bonni, A., Frank, D.A., Schindler, C. & Greenberg, M.E. (1993) Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science*, **262**, 1575-1579.
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D.A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G.D. & Greenberg, M.E. (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*, **278**, 477-483.
- Boulanger, M.J., Bankovich, A.J., Kortemme, T., Baker, D. & Garcia, K.C. (2003a) Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell*, **12**, 577-589.
- Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E. & Garcia, K.C. (2003b) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, **300**, 2101-2104.
- Boulton, T.G., Stahl, N. & Yancopoulos, G.D. (1994) Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem*, **269**, 11648-11655.
- Boulton, T.G., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., Stahl, N. & Yancopoulos, G.D. (1995) STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6915-6919.
- Chevalier, S., Fourcin, M., Robledo, O., Wijdenes, J., Pouplard-Barthelaix, A. & Gascan, H. (1996) Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem*, **271**, 14764-14772.
- Curtis, R., Adryan, K.M., Zhu, Y., Harkness, P.J., Lindsay, R.M. & DiStefano, P.S. (1993) Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature*, **365**, 253-255.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Ip, N.Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P.S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H. & et al. (1993a) Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science*, **259**, 1736-1739.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1993b) LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*, **260**, 1805-1808.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Valenzuela, D.M., Wong, V.V., Furth, M.E., Squinto, S.P. & Yancopoulos, G.D. (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*, **253**, 59-63.
- DeChiara, T.M., Vejsada, R., Poueymirou, W.T., Acheson, A., Suri, C., Conover, J.C., Friedman, B., McClain, J., Pan, L., Stahl, N. & et al. (1995) Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*, **83**, 313-322.
- Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A.,

- deLapeyriere, O., Gascan, H. & Chevalier, S. (2004) Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4827-4832.
- Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A.B., Delneste, Y., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F. & Gascan, H. (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*, **3**, 867-872.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S. & Yoshimura, A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, **387**, 921-924.
- Gearing, D.P., Comeau, M.R., Friend, D.J., Gimpel, S.D., Thut, C.J., McGourty, J., Brasher, K.K., King, J.A., Gillis, S., Mosley, B. & et al. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*, **255**, 1434-1437.
- Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L. & Mosley, B. (1994) Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1119-1123.
- Grotzinger, J. (2002) Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 215-223.
- Grotzinger, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Kalai, M. & Rose-John, S. (1997) The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins*, **27**, 96-109.
- Guillet, C., Auguste, P., Mayo, W., Kreher, P. & Gascan, H. (1999) Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci*, **19**, 1257-1262.
- Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G.R. & et al. (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J*, **14**, 1421-1429.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G. & Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, **374**, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, **334**, 297-314.
- Helgren, M.E., Squinto, S.P., Davis, H.L., Parry, D.J., Boulton, T.G., Heck, C.S., Zhu, Y., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M. & DiStefano, P.S. (1994) Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell*, **76**, 493-504.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, **63**, 1149-1157.
- Kahn, M.A., Huang, C.J., Caruso, A., Barresi, V., Nazarian, R., Condorelli, D.F. & de Vellis, J. (1997) Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells. *J Neurochem*, **68**, 1413-1423.
- Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., Pfeffer, K. & Muller, M. (2000) Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*, **13**, 549-560.
- Kaur, N., Wohlhueter, A.L. & Halvorsen, S.W. (2002) Activation and inactivation of signal transducers and activators of transcription by ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cells. *Cell Signal*, **14**, 419-429.

- Lai, C.F., Ripperger, J., Morella, K.K., Wang, Y., Gearing, D.P., Fey, G.H. & Baumann, H. (1995) Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J Biol Chem*, **270**, 14847-14850.
- Lambert, P.D., Anderson, K.D., Sleeman, M.W., Wong, V., Tan, J., Hajarunguru, A., Corcoran, T.L., Murray, J.D., Thabet, K.E., Yancopoulos, G.D. & Wiegand, S.J. (2001) Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4652-4657.
- Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G.C., Gauchat, J.F. & Gascan, H. (2001) Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem*, **276**, 22476-22484.
- Linker, R.A., Maurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K.V., Sendtner, M. & Gold, R. (2002) CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med*, **8**, 620-624.
- Lutticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T. & et al. (1994a) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, **263**, 89-92.
- Lutticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T. & et al. (1994b) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, **263**, 89-92.
- Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G. & Thoenen, H. (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*, **365**, 27-32.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M. & Schreiber, R.D. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, **84**, 431-442.
- Mitsumoto, H., Ikeda, K., Klinkosz, B., Cedarbaum, J.M., Wong, V. & Lindsay, R.M. (1994) Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science*, **265**, 1107-1110.
- Murakami, M., Kamimura, D. & Hirano, T. (2004) New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors*, **22**, 75-77.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. & Kishimoto, T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, **387**, 924-929.
- Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T. & Taga, T. (1994) Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2285-2289.
- Nicholson, S.E., Willson, T.A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J.G., Baca, M., Alexander, W.S., Metcalf, D., Hilton, D.J. & Nicola, N.A. (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *Embo J*, **18**, 375-385.
- Oh, H., Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Matsui, H., Kishimoto, T. & Yamauchi-Takahara, K. (1998) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **273**, 9703-9710.

- Olivier, C., Auguste, P., Chabbert, M., Lelievre, E., Chevalier, S. & Gascan, H. (2000) Identification of a gp130 cytokine receptor critical site involved in oncostatin M response. *J Biol Chem*, **275**, 5648-5656.
- Oppenheim, R.W., Prevette, D., Yin, Q.W., Collins, F. & MacDonald, J. (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science*, **251**, 1616-1618.
- Oyesiku, N.M. & Wigston, D.J. (1996) Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons. *J Comp Neurol*, **364**, 68-77.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G. & Ihle, J.N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, **93**, 385-395.
- Plun-Favreau, H., Elson, G., Chabbert, M., Froger, J., deLapeyriere, O., Lelievre, E., Guillet, C., Hermann, J., Gauchat, J.F., Gascan, H. & Chevalier, S. (2001) The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J*, **20**, 1692-1703.
- Plun-Favreau, H., Perret, D., Diveu, C., Froger, J., Chevalier, S., Lelievre, E., Gascan, H. & Chabbert, M. (2003) Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor. *J Biol Chem*, **278**, 27169-27179.
- Rao, M.S., Tyrrell, S., Landis, S.C. & Patterson, P.H. (1992) Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons. *Dev Biol*, **150**, 281-293.
- Robledo, O., Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Auguste, P., Pouplard-Barthelais, A., Pennica, D. & Gascan, H. (1997) Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem*, **272**, 4855-4863.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E.M., Jr. & Schreiber, R.D. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, **93**, 373-383.
- Rousseau, F., Gauchat, J.F., McLeod, J.G., Chevalier, S., Guillet, C., Guilhot, F., Cognet, I., Froger, J., Hahn, A.F., Knappskog, P.M., Gascan, H. & Boman, H. (2006) Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10068-10073.
- Schiemann, W.P., Graves, L.M., Baumann, H., Morella, K.K., Gearing, D.P., Nielsen, M.D., Krebs, E.G. & Nathanson, N.M. (1995) Phosphorylation of the human leukemia inhibitory factor (LIF) receptor by mitogen-activated protein kinase and the regulation of LIF receptor function by heterologous receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5361-5365.
- Sendtner, M., Schmalbruch, H., Stockli, K.A., Carroll, P., Kreutzberg, G.W. & Thoenen, H. (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*, **358**, 502-504.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. & et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, **263**, 92-95.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. & Yancopoulos, G.D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, **267**, 1349-1353.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A. & Hilton, D.J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, **387**, 917-921.

- Stockli, K.A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D. & Thoenen, H. (1989) Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*, **342**, 920-923.
- Symes, A.J., Rao, M.S., Lewis, S.E., Landis, S.C., Hyman, S.E. & Fink, J.S. (1993) Ciliary neurotrophic factor coordinately activates transcription of neuropeptide genes in a neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 572-576.
- Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J. & Deguchi, T. (1994) A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet*, **7**, 79-84.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3801-3804.
- Thaler, C.D., Suhr, L., Ip, N. & Katz, D.M. (1994) Leukemia inhibitory factor and neurotrophins support overlapping populations of rat nodose sensory neurons in culture. *Dev Biol*, **161**, 338-344.
- Thoma, B., Bird, T.A., Friend, D.J., Gearing, D.P. & Dower, S.K. (1994) Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J Biol Chem*, **269**, 6215-6222.
- Thomis, D.C., Gurniak, C.B., Tivol, E., Sharpe, A.H. & Berg, L.J. (1995) Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science*, **270**, 794-797.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0034.
- Wegenka, U.M., Luttkien, C., Buschmann, J., Yuan, J., Lottspeich, F., Muller-Esterl, W., Schindler, C., Roeb, E., Heinrich, P.C. & Horn, F. (1994) The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. *Mol Cell Biol*, **14**, 3186-3196.
- Yao, Z., Cui, Y., Watford, W.T., Bream, J.H., Yamaoka, K., Hissong, B.D., Li, D., Durum, S.K., Jiang, Q., Bhandoola, A., Hennighausen, L. & O'Shea, J.J. (2006) Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1000-1005.
- Yoshimura, A. (2005) Negative regulation of cytokine signaling. *Clin Rev Allergy Immunol*, **28**, 205-220.
- Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Hara, T. & Miyajima, A. (1995) A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J*, **14**, 2816-2826.
- Yssel, H., De Vries, J.E., Koken, M., Van Blitterswijk, W. & Spits, H. (1984) Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J Immunol Methods*, **72**, 219-227.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C. & Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*, **267**, 1990-1994.

## Discussion

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont des médiateurs solubles qui ont un très large spectre d'action entraînant des réponses biologiques variées (Heinrich *et al*, 1998). Un élément important du système cytokine/récepteur de la famille de l'IL-6 est le phénomène de redondance fonctionnelle entre certaines cytokines de cette famille. Le récepteur au CNTF possède trois ligands : le CNTF, le complexe CLC/CLF et la neuropoïétine (Ip and Yancopoulos, 1992; Ip *et al*, 1993; Elson *et al*, 2000; Derouet *et al*, 2004). La chaîne  $\alpha$  spécifique de ce récepteur, le CNTFR $\alpha$ , est exprimée durant le développement des précurseurs neuronaux dans le neuro-épithélium et la crête neurale (Ip *et al*, 1993). Les similarités d'activités des trois ligands du CNTFR $\alpha$  suggèrent une redondance fonctionnelle importante entre le CNTF, CLC et la neuropoïétine (Sleeman *et al*, 2000; Lelievre *et al*, 2001; Derouet *et al*, 2004; Vlotides *et al*, 2004).

Le gène de la neuropoïétine chez l'humain présente une délétion de 8 nucléotides, entraînant un décalage du cadre de lecture et la synthèse d'une protéine non fonctionnelle (Derouet *et al*, 2004). Le gène de la neuropoïétine étant inactif chez l'humain, ceci implique une mise en place différente du développement nerveux en comparaison avec celui des autres mammifères comme la souris ou le singe qui possède la neuropoïétine (Derouet *et al*, 2004). Cette cytokine, au même titre que le CNTF et CLC, peut permettre la survie *in vitro* de motoneurones murins (Arakawa *et al*, 1990; Forger *et al*, 2003; Derouet *et al*, 2004) et pourrait jouer ce rôle *in vivo* au moment de l'embryogenèse. L'éventualité d'une copie fonctionnelle du gène de la neuropoïétine située dans une autre partie du génome humain a été envisagée mais aucun transcrit n'a été mis en évidence. La séquence de cette protéine semble hautement conservée entre les espèces (Derouet *et al*, 2004) suggérant que ce gène a subi une pression de sélection importante au cours de l'évolution et n'a évolué que récemment vers un pseudogène chez l'humain. L'apparition de pseudogènes dans les génomes serait la marque de l'adaptation d'un organisme à son environnement. La pression de sélection sur une fonction liée à un gène ou une famille de gènes particuliers sera plus ou moins forte en fonction de son avantage évolutif pour l'espèce en terme de survie (Zhang, 2003).



Par exemple, des études récentes de génomique comparative ont démontré que la proportion de pseudogènes dans la famille des gènes codant pour les récepteurs olfactifs était significativement plus élevée chez l'homme que chez les grands singes et la souris (Gilad *et al*, 2003). De plus, la neuropoïétine possède une forte similarité avec le « Receptivity Factor ». Cette protéine est une phéromone de Salamandre qui présente des propriétés structurales communes avec les « neuro-cytokines » de la famille de l'IL-6 (Rollmann *et al*, 1999). Si le « Receptivity Factor » est l'orthologue de la neuropoietine chez la salamandre, l'hypothèse d'une fonction de cette cytokine au niveau du sens de l'odorat, fonction qui aurait été perdue chez l'homme, serait à étudier.

La localisation du gène codant pour la neuropoïétine à proximité du gène de la CT-1 suggère une duplication récente qui pourrait également expliquer l'origine de la redondance fonctionnelle de ces cytokines (Prince and Pickett, 2002) et la résistance relative d'un organisme à l'inactivation d'un de ces gènes comme dans le cas du CNTF (Takahashi *et al*, 1994) ou de la neuropoïétine (Derouet *et al*, 2004). Les souris inactivées pour le gène du CNTF ne présentent pas d'anomalies neurologiques particulières et sont viables (Masu *et al*, 1993). Cette observation est corrélée avec la présence de mutations inactivant le gène du CNTF pour 2% de la population humaine et qui n'entraînent pas de troubles neurologiques (Takahashi *et al*, 1994). Ces sujets ne possèdent donc qu'un seul des trois ligands du récepteur au CNTF et ne présentent aucune pathologie, suggérant un rôle essentiel de CLC et une redondance fonctionnelle entre les ligands du CNTFR.

A contrario, les souris déficientes pour le CNTFR $\alpha$  meurent rapidement après la naissance et présentent une perte importante de motoneurones (DeChiara *et al*, 1995). Les souris CLF $^{-/-}$  ne se nourrissent pas spontanément et meurent rapidement après leur naissance l'estomac vide (Alexander *et al*, 1999a). Le phénotype des souris LIFR $\beta^{-/-}$  est létal, les embryons présentant des anomalies du développement des os (Ware *et al*, 1995). L'inactivation de la chaîne gp130 entraîne la mort des animaux avant la naissance, gp130 jouant un rôle crucial dans le développement du myocarde et dans l'hématopoïèse durant l'embryogenèse (Yoshida *et al*, 1996). L'inactivation de ces trois chaînes du récepteur démontre donc un rôle majeur unique de chacune d'elle dans le développement. Les souris déficientes pour le gène du LIF montrent une

diminution importante du nombre de cellules souches de la moelle osseuse et de la rate (Escary *et al*, 1993). Le LIF supporte également la survie des motoneurones *in vitro* et *in vivo* (Martinou *et al*, 1992). L'inactivation du CNTF entraîne chez la souris adulte une perte et une atrophie progressive de motoneurones provoquant une diminution de la force musculaire (Masu *et al*, 1993). Les souris inactivées pour ces deux cytokines présentent une perte en motoneurones plus importante que les souris déficientes pour un seul de ces gènes (Sendtner *et al*, 1996). Le triple Knock-Out de CNTF, du LIF et de la CT-1 a permis de définir des rôles distincts et coopératifs de ces facteurs sur le maintien et la fonction des motoneurones (Holtmann *et al*, 2005). L'inactivation du gène de la neuropoïétine chez la souris permettra de mieux comprendre le rôle de cette cytokine dans le développement nerveux. L'analyse du phénotype de souris inactivées pour deux, voire trois des ligands alternatifs du récepteur au CNTF permettra également de déterminer le rôle précis de ces cytokines au cours du développement. De plus, le modèle murin de Knock-In inducible pour CLC nous permettra d'étudier le rôle de sa cinétique d'expression en contrôlant son inactivation de façon précise au cours du développement. D'après toutes ces observations, il est certain que les trois ligands du CNTFR ont des fonctions redondantes, mais l'inactivation de ces trois gènes nous permettra de mieux appréhender leurs rôles distincts respectifs, et de vérifier l'importance fonctionnelle de CLC et de la neuropoïétine.

Dans le but de comprendre le rôle de la neuropoïétine dans le développement murin, nous avons d'abord analysé les voies de signalisation induites par cette cytokine, et nous les avons comparées avec celles activées par le CNTF. Notre analyse démontre une redondance entre les voies recrutées par le CNTF et la neuropoïétine. A l'aide d'anticorps bloquant les chaînes réceptrices du récepteur au CNTF, nous avons montré que la neuropoïétine et le CNTF reconnaissent la chaîne gp130 à travers le même épitope. L'implication de STAT3 dans la signalisation du CNTF a été démontrée initialement en utilisant des cellules de neuroblastomes ou des systèmes de récepteurs reconstitués dans des lignées de fibroblastes (Bonni *et al*, 1993; Stahl *et al*, 1995). Nous avons également montré que STAT3 jouait un rôle majeur dans la signalisation induite par la neuropoïétine. Or STAT3 est essentiel pour le développement précoce de

l'embryon de souris (Takeda *et al*, 1997). La neuropoïétine s'exprimant durant l'embryogenèse (Derouet *et al*, 2004), l'expression de cette cytokine et du facteur STAT3 pourrait jouer un rôle majeur dans le développement du système nerveux murin. Les effets de cette cytokine sur les cellules d'origine gliale restent cependant à déterminer. La neuropoïétine recrute aussi la voie PI3-kinase/AKT. Cette voie est activée en amont de la voie des MAP kinases qui sont également phosphorylées après l'induction cellulaire de la neuropoïétine. De plus, SOCS-3 qui est un inhibiteur efficace de la voie de signalisation JAK/STAT, régule de façon négative le signal induit par CNTF (Kaur *et al*, 2002). Nous avons montré que la neuropoïétine entraînait une forte expression de SOCS-3 renforçant l'idée d'un mode de régulation similaire pour le CNTF et la neuropoïétine. Dans des lignées cellulaires de neuroblastomes, la neuropoïétine recrute les voies de signalisation JAK/STAT, ainsi que les voies de la PI3-kinase/Akt, des MAP kinases et des SOCS.

De plus, le CNTF est connu pour modifier l'expression de différents neuropeptides, en particulier, il augmente l'expression du VIP (Rao *et al*, 1992). Nous avons donc vérifié si la neuropoïétine avait le même effet que le CNTF sur l'expression du VIP. Les mécanismes moléculaires par lesquels la neuropoïétine influence la survie neuronale et la différenciation ne sont pas connus. Pour commencer à caractériser les mécanismes de signalisation intracellulaire activés par la neuropoïétine, nous avons étudié ces effets sur des cellules de neuroblastomes. Ces cellules ont pour origine des cellules de la crête neurale (Tsokos *et al*, 1987). Nous avons montré que la neuropoïétine induisait une forte augmentation de l'expression du VIP dans les cellules de neuroblastomes SK-N-GP d'une façon dose dépendante. Les changements dans le taux d'expression du VIP apparaissent après deux heures de traitement et continue d'augmenter au moins jusqu'à 24h. Le VIP est un neuropeptide de 28 acides aminés largement distribué dans le système nerveux. Le VIP, exprimé lors du développement embryonnaire, affecte la prolifération des précurseurs neuronaux et la différenciation neuronale (Cazillis *et al*, 2004). L'utilisation d'antagonistes spécifiques du VIP induit une sévère microencéphalie démontrant un rôle important du VIP dans le développement cérébral (Gressens *et al*, 1997). De plus, il a été montré que le VIP était un régulateur du NGF dans les embryons de

souris où il stimulerait la relâche de NGF (Hill *et al*, 2002). Le profil d'expression de la neuropoïétine est restreint au système nerveux central uniquement durant le développement embryonnaire (Derouet *et al*, 2004). Cette particularité est corrélée avec l'expression du VIP. De plus, nous avons montré une augmentation de l'expression de TrkA qui correspond à une chaîne du récepteur au NGF, et il a été montré que le VIP entraînait une augmentation de l'expression de ce facteur. Il est donc possible que la neuropoïétine induise une augmentation de l'expression du TrkA par l'intermédiaire du VIP pour répondre à une augmentation de l'expression du NGF. Cette boucle de régulation pourrait intervenir dans la mise en place du système nerveux lors de l'embryogenèse. Cette étude renforce la similarité fonctionnelle entre la neuropoïétine et le CNTF. CLC active également ces mêmes voies de signalisation (Lelievre *et al*, 2001), confirmant ainsi la redondance de ces trois ligands dans la signalisation induite par l'intermédiaire du récepteur au CNTF. Des études supplémentaires sur des cultures primaires de neurones pourraient nous apporter des informations complémentaires dans la compréhension de la biologie de la neuropoïétine. L'inactivation du gène de la neuropoïétine, comme l'inactivation des trois ligands du récepteur au CNTF nous donnera des informations majeures sur les voies de transduction du signal empruntées au cours du développement du système nerveux.

Une des différences majeures entre les ligands du récepteur au CNTF est la possibilité de former avec la forme soluble du récepteur, un complexe actif. En effet, en plus de ses actions neuronales, le CNTF peut provoquer des effets biologiques dans des cellules non neuronales comme les cellules gliales (Hughes *et al*, 1988; Louis *et al*, 1993b), les hépatocytes (Schooltink *et al*, 1992), les cellules du muscle squelettique (Helgren *et al*, 1994), les cellules souches embryonnaires (Conover *et al*, 1993). Comme pour le récepteur à l'IL-6, IL-6R $\alpha$ , qui sert de médiateur à l'homodimérisation des chaînes gp130 (Kishimoto *et al*, 1995), CNTFR $\alpha$  peut fonctionner sous forme liée à la membrane (Davis *et al*, 1991; Ip *et al*, 1993) ou sous forme soluble. La forme soluble (sCNTFR) est produite par clivage de la forme membranaire par la phospholipase C, et sert de

cofacteur dans la potentialisation des actions du CNTF sur les cellules qui expriment gp130 et LIFR (Davis *et al*, 1993a). Bien que la plupart des récepteurs solubles pour les cytokines ou les facteurs de croissance agisse de façon antagoniste avec leur équivalent membranaire, le récepteur soluble du CNTFR garde sa capacité à lier le CNTF et agit comme un facteur agoniste paracrine ou autocrine (Marz *et al*, 1999). L'hétérodimère constitué du CNTF et de son récepteur soluble peut entraîner un signal cellulaire indépendamment de l'expression endogène de CNTFR $\alpha$  en se liant avec les sous-unités  $\beta$  gp130 et LIFR $\beta$  (Davis *et al*, 1993a; Rose-John and Heinrich, 1994; Stahl *et al*, 1994). La forme soluble du CNTFR $\alpha$  a été détectée dans le fluide cérébrospinal et le sérum (Davis *et al*, 1993a; Helgren *et al*, 1994), suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans des effets non neuronaux du CNTF comme dans la phase aiguë de la réponse hépatique (Dittrich *et al*, 1994). Bien que le complexe CNTF/sCNTFR $\alpha$  n'ait pas encore été identifié *in vivo*, des évidences suggèrent que ce dimère serait relâché suite à une lésion et exercerait potentiellement son action sur les astrocytes (Ozog *et al*, 2004).

Le CNTF est seulement relâché après une lésion avec une perte de l'intégrité membranaire. Des taux accrus de CNTFR $\alpha$  soluble ont été détectés après une lésion, suggérant que l'activité du CNTFR $\alpha$  comme un facteur relâché est d'une importance physiologique (Panayotatos *et al*, 1994; Di Marco *et al*, 1997). L'interaction de ce complexe pourrait ne pas être restreinte au système nerveux central mais il pourrait être capable d'influencer d'autres systèmes (Ozog *et al*, 2004). En effet, *in vitro*, le CNTFR $\alpha$  seul ou en combinaison avec le CNTF favorise le chimiotactisme des macrophages (Kobayashi and Mizisin, 2000). Ainsi, ce complexe pourrait entraîner un stimulus chimiotactique qui initierait le recrutement précoce des macrophages après une lésion nerveuse (Kobayashi and Mizisin, 2000), démontrant ainsi un rôle potentiel de ce complexe en dehors du système nerveux central.

Le CNTFR membranaire ne possède pas de domaine cytoplasmique (Davis *et al*, 1991), et n'est pas connu pour interagir directement avec les médiateurs intracellulaires. Il est peu probable que les deux isoformes du récepteur (soluble et membranaire) soient différentes dans leur capacité à induire le signal. Une possibilité est que les deux isoformes diffèrent dans leur capacité à être

internalisées après activation par le ligand (DiStefano *et al*, 1996), ce qui pourrait entraîner des actions agonistes ayant des cinétiques différentes (Di Marco *et al*, 1997).

Au contraire du CNTF qui a une action à distance en complexe avec le récepteur soluble, CLC et la neuropoïétine ne semblent pas présenter de fonctions biologiques avec le CNTFR soluble (Di Marco *et al*, 1997; Plun-Favreau *et al*, 2001; Derouet *et al*, 2004). En effet, le CNTFR soluble permet la sécrétion de CLC quand ils sont co-exprimés dans la même cellule (Plun-Favreau *et al*, 2001). La co-expression de ces deux partenaires est indispensable à une activité biologique potentielle sur une cellule exprimant uniquement les deux chaînes gp130 et LIFR $\beta$  (Plun-Favreau *et al*, 2001). En revanche, l'addition des molécules purifiées, CLC et sCNTFR, sur des cellules n'exprimant pas la chaîne alpha est sans effet biologique contrairement à l'addition de CNTF et CNTFR soluble. De plus, le CNTF est relâché suite à une lésion, alors que CLC nécessite d'être complexée dans la cellule à une chaîne réceptrice (CLF ou CNTFR ) pour être sécrétée (Elson *et al*, 2000; Plun-Favreau *et al*, 2001). CLC et la neuropoïétine ont donc une action restreinte aux cellules exprimant la chaîne alpha du récepteur et sont dépendantes de l'expression du récepteur alpha. Une différence majeure entre ces deux ligands sécrétés est l'expression temporelle de ces cytokines : la neuropoïétine est exprimée seulement durant l'embryogenèse (Derouet *et al*, 2004) alors que CLC est aussi bien exprimée chez l'adulte (Senaldi *et al*, 1999; Shi *et al*, 1999) que dans l'embryon (de Bovis *et al*, 2005).

L'expression de la neuropoïétine est restreinte chez la souris aux zones de développement de précurseurs neuronaux du système nerveux central des embryons. Son mode de sécrétion simple, par rapport aux deux autres ligands connus du CNTFR $\alpha$ , fait de la neuropoïétine un facteur de croissance et de survie autocrine pour les cellules du neuroépithélium au moment du développement. Son expression reflète également celle du CNTFR $\alpha$  au niveau des neurones du système nerveux central chez la souris (Ip *et al*, 1993; Derouet *et al*, 2004). Ceci suggère donc un rôle de la neuropoïétine dans le développement nerveux. La neuropoïétine se retrouvant sous forme de pseudogène chez l'humain, nous

avons choisi de générer un Knock-Out classique pour cette protéine. La stratégie consiste à insérer en aval du codon initiateur du gène de la neuropoïétine, deux gènes rapporteurs (LacZ et eGFP codés par un ARN polycistronique), qui nous permettront d'établir le profil d'expression de cette cytokine. Cependant, son implication dans le développement du système nerveux laisse à penser que le phénotype de cette souris transgénique pourrait être létal puisqu'il semble que la neuropoïétine permette la mise en place des neurones au moment de l'embryogenèse (Derouet *et al*, 2004). L'analyse de ces souris Knock-Out permettra de caractériser les ligands du CNTFR. Des analyses de structures/fonctions de ces ligands pourront être envisagées et interviendront peut-être dans le design de nouveaux antagonistes pour le récepteur au CNTF.

Quant à CLC, des données récentes ont montré que son inactivation, comme celle de CLF, entraînait un syndrome CISS chez l'Homme (Knappskog *et al*, 2003; Rousseau *et al*, 2006). Les souris inactivées pour le gène de CLF meurent rapidement après la naissance suite à une absence de prise de nourriture (Alexander *et al*, 1999a). Il est donc envisageable que le phénotype de la souris CLC<sup>-/-</sup> soit proche de celui des souris CLF<sup>-/-</sup>. C'est pourquoi, pour palier aux risques d'obtenir un phénotype létal, nous avons élaboré un modèle de souris Knock-In inducible dans le but d'inactiver le gène de CLC de façon spatio-temporelle. L'exon 3 du gène de CLC a été flanqué des sites LoxP permettant une délétion de la région se trouvant entre ces sites. L'utilisation de souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle de promoteurs connus, nous permettra d'inactiver le gène dans des tissus spécifiques ou à un moment précis du développement. Le gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase a été introduit pour s'exprimer uniquement en l'absence de CLC, et servira pour étudier le profil d'expression de cette cytokine.

Deux syndromes impliquant des mutations dans des récepteurs de cytokine de la famille de l'IL-6 ont été décrits. Il s'agit du syndrome de Stüve-Wiedemann (ou SWS) (Dagoneau *et al*, 2004) qui met en cause des mutations inactivant le gène du LIFR $\beta$  et du syndrome de Sohar (ou CISS pour « Cold Induced Sweating Syndrom ») (Knappskog *et al*, 2003) qui présente des mutations dans le gène de CLF. Ces patients présentent des symptômes particuliers, comme une insensibilité à la douleur, une atrophie musculaire et des troubles de l'appétit

(Knappskog *et al*, 2003). La comparaison des symptômes des patients atteints de SWS ou de CISS montre certains traits communs. Les patients « SWS » ont également des troubles de l'appétit et une diminution de la perception de la douleur. Ces patients peuvent également présenter une sudation excessive et des scolioses (Al-Gazali *et al*, 2003). Le syndrome de Stüve-Wiedemann est cependant plus drastique que le syndrome CISS. En effet, ces patients souffrent également d'épisodes d'hyperthermie, de détresse respiratoire, d'hypotonie musculaire et présentent un cintrage des os longs au niveau des membres. Ces symptômes causent généralement une mort précoce, au contraire des patients « CISS » (Knappskog *et al*, 2003; Dagoneau *et al*, 2004). Les différents symptômes présentés rappellent les phénotypes observés chez les souris dont les gènes du LIFR $\beta$  (Li *et al*, 1995; Ware *et al*, 1995) ou du CLF (Alexander *et al*, 1999a) ont été inactivés. En effet, les souris CLF<sup>-/-</sup> ne se nourrissent pas spontanément et meurent rapidement après leur naissance l'estomac vide. Le phénotype des souris LIFR $\beta$ <sup>-/-</sup> est létal, les embryons présentant des anomalies du développement des os. Le phénotype plus sévère du SWS par rapport au CISS s'explique par l'implication du LIFR $\beta$  dans les complexes récepteurs de plusieurs cytokines de la famille de l'IL-6. Ces résultats suggèrent donc que la cytokine composite CLC/CLF est impliquée dans des mécanismes physiologiques précis chez l'homme. Récemment, le séquençage du gène de CLF chez un autre patient présentant certains symptômes du syndrome CISS, et notamment l'hyperhidrose associée à des scolioses et à des coudes fixes, n'a pas permis d'identifier des mutations altérant la fonction de cette protéine (Rousseau *et al*, 2006). Cependant, l'analyse du gène de CLC a indiqué la présence de mutations non synonymes hétérozygotes sur les deux allèles. Une de ces mutations entraîne la formation d'un codon stop (Y107X) au tiers de la protéine. La deuxième mutation (R197L) est située au niveau d'un motif de résidus conservés dans la partie C-terminale de cette cytokine. Ce motif est constitué d'un résidu arginine et d'un résidu aspartate qui sont conservés entre les différents ligands du CNTFR $\alpha$ . La reconstitution *in vitro* de ces mutations démontre que le CLC Y107X n'est pas exprimé. Cette mutation stop empêche sa synthèse. La mutation R197L est prédite dans le site I de CLC, site correspondant au site d'interaction de cette cytokine avec le CNTFR $\alpha$  (Perret *et al*, 2004). Cette mutation abolit l'interaction



du CLC avec le CNTFR $\alpha$ . En revanche, la mutation R197L n'abolit pas l'interaction de CLC avec CLF, ce qui confirme l'observation que ces deux protéines (CLF et CNTFR $\alpha$ ) interagissent avec CLC par un site différent (Perret *et al*, 2004).

Cette étude démontre donc que la cytokine composite CLC/CLF possède des activités biologiques non-redondantes chez l'homme par rapport au CNTF (Takahashi *et al*, 1994) ou par rapport à la neuropoïétine (Derouet *et al*, 2004). L'implication de CLC dans des mécanismes physiologiques ne semble pas redondante avec les autres cytokines de la famille de l'IL-6. Les différents symptômes associés à des mutations inactivant chez l'homme soit la fonction de CLC, soit la fonction de CLF suggèrent plusieurs rôles physiologiques de cette cytokine composite.

Une première activité est relative à l'atrophie musculaire des mains, à l'extension limitée des bras et au faciès particulier qui sont observés chez les patients CISS. En effet, ces observations suggèrent un rôle du CLC/CLF dans le maintien des motoneurones au niveau des muscles squelettiques. L'inactivation du gène du CNTFR $\alpha$  entraîne la perte de 40% des motoneurones de la face chez la souris (DeChiara *et al*, 1995). Le faciès sans expression des patients CISS pourrait refléter en partie ce phénotype et suggère donc un rôle de CLC/CLF dans le maintien des motoneurones régulant l'activité des muscles du visage. En revanche, cette hypothèse de modification de l'expression du faciès sera difficilement vérifiable et analysable avec les souris Knock-In pour le gène de CLC.

Une deuxième activité est suggérée par les différents symptômes de scolioses dont souffrent les patients. Le CLC/CLF pourrait ainsi agir comme le LIF sur le remodelage osseux (Allan *et al*, 1990). Cependant, les souris CLF<sup>-/-</sup> ne présentent pas d'anomalies morphologiques évidentes mais meurent rapidement après la naissance. L'analyse du squelette des souris inactivées pour le gène de CLC nous permettra de visualiser des modifications éventuelles au niveau des os longs et de la colonne vertébrale.

Un troisième rôle de CLC/CLF est une action potentielle sur les glandes sudoripares. La réponse physiologique correcte de ces glandes est influencée par leur innervation sympathique. Cette innervation subit un changement

phénotypique au cours du développement (Grant *et al*, 1995). En effet, les axones sympathiques qui innervent les glandes sont initialement noradrénergiques. Un facteur soluble sécrété par les glandes sudoripares va agir sur ces axones pour induire un changement de phénotype noradrénergique vers un phénotype cholinergique (Grant *et al*, 1995). Cette étape est nécessaire pour le fonctionnement correct de ces glandes. Ce changement phénotypique peut être stimulé par différentes cytokines de la famille de l'IL-6 comme le CNTF (Rao *et al*, 1992), le LIF (Yamamori *et al*, 1989) et la CT-1 (Habecker *et al*, 1995). Le facteur soluble produit par les glandes sudoripares permettant ce changement *in vivo*, a été partiellement isolé (Habecker *et al*, 1997). Il agit sur les axones en recrutant gp130 et le LIFR $\beta$  mais n'est ni le CNTF, ni le LIF. La dérégulation de la sudation chez les patients souffrant du syndrome CISS suggère que le CLC associé au CLF ou au CNTFR $\alpha$  soluble pourrait être ce facteur.

Une quatrième fonction potentielle de CLC/CLF pourrait être le maintien de neurones sensoriels périphériques. La caractéristique des patients atteints du syndrome CISS est un déficit marqué dans la nociception, la sensation de chaleur, et la régulation de la transpiration (Knappskog *et al*, 2003). Ce phénotype indique des rôles spécifiques non redondants de CLC/CLF dans le développement du système nerveux périphérique. L'insensibilité à la douleur a également été identifiée dans d'autres syndromes comme le syndrome CIPA (pour Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis). Cette pathologie est liée à des mutations inactivant le récepteur au NGF (*TrkA*). Contrairement aux patients atteints du syndrome CIPA, les patients atteints de CISS n'ont pas de retard mental (Indo *et al*, 1996; Knappskog *et al*, 2003). La sensation de chaleur est relayée par des neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (dorsal root ganglia (DRG)), qui se terminent par des extrémités nerveuses libres dans la peau (Patapoutian *et al*, 2003). Ceci implique l'activation des récepteurs couplés à un canal voltage-dépendant impliqués dans la sensation de chaleur (thermoTRPVs) (Patapoutian *et al*, 2003; Tominaga and Caterina, 2004). Certains de ces récepteurs sont régulés par des cytokines telles que le NGF ou l'IGF-1 (Kanzaki *et al*, 1999; Chuang *et al*, 2001; Ji *et al*, 2002). CLC/CLF pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de la nociception et de la sensation de chaleur par les neurones du DRG qui innervent la peau. L'analyse de l'expression des

thermorécepteurs TRPV dans les souris inactivées pour le gène de CLC nous permettra de vérifier l'implication de cette cytokine dans la perception de la douleur. Le nombre de neurones DRG pourra être comparé entre les souris inactivées pour le gène de CLC et les souris sauvages, ainsi que l'expression des récepteurs thermoTRPVs. Des tests de sensibilité comme le test du laser ou le test à la formaline permettront également de comparer la nociception chez les souris CLC<sup>-/-</sup> et les souris sauvages. La compréhension de cette fonction pourra servir à trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter la douleur, avec la possibilité d'induire une analgésie en bloquant cette cytokine. Le troisième ligand du CNTFR, la neuropoïétine pourrait cependant compliquer les expériences avec le Knock-In de CLC. C'est pourquoi, nous avons également initié la production d'une souris inactivée pour le gène de la neuropoïétine.

Une dernière fonction potentielle du CLC/CLF pourrait être liée au contrôle de la balance énergétique et de la sensation de faim. Plusieurs études ont suggéré un rôle de la voie du récepteur du CNTF dans ce domaine après l'analyse de l'inactivation du gène du CNTFR $\alpha$  chez la souris. En effet, ces animaux modifiés ne se nourrissent pas et meurent l'estomac vide après leur naissance (DeChiara *et al*, 1995). Les centres de la régulation de la balance énergétique sont localisés dans l'hypothalamus. Les différentes chaînes du récepteur tripartite au CNTF sont exprimées dans cette zone du cerveau (Gloaguen *et al*, 1997) et pourraient y jouer un rôle comme le suggère les différents phénotypes associés à l'inactivation de leurs gènes (DeChiara *et al*, 1995; Dagoneau *et al*, 2004). De plus, une étude récente démontre que l'administration au niveau du système nerveux central de CNTF augmente la neurogénèse dans les centres de régulation de la faim de l'hypothalamus chez la souris (Kokoeva *et al*, 2005). L'analyse des souris dont le gène du CNTF est inactivé montre qu'elles ne présentent pas de phénotype particulier, il en est de même pour les sujets ayant une déficience de ce gène (Takahashi *et al*, 1994). Au contraire, les souris dont le gène du CLF est inactivé présentent un phénotype relativement similaire aux souris CNTFR<sup>-/-</sup> (Alexander *et al*, 1999a; Forger *et al*, 2003); il est également corrélé aux symptômes de certains patients CISS. Ces observations suggèrent que le CLC/CLF pourrait être le ligand du récepteur tripartite au CNTF au niveau de l'hypothalamus et pourrait ainsi jouer un rôle dans la balance énergétique et la prise alimentaire.

La comparaison des symptômes des patients ayant des mutations dans CLC ou CLF indique cependant certaines différences. Le patient « déficient » pour CLC présente une neuropathie des nerfs sensitifs, ce qui n'est pas décrit chez les autres patients. De plus, seuls les patients ayant des mutations inactivant le gène de CLF ont des troubles de l'appétit. D'autre part, l'analyse de la distribution tissulaire de CLC et CLF par hybridation *in situ* et par PCR quantitative chez la souris, démontre que ces deux molécules ne sont pas strictement co-localisées. Le transcrit de CLF est ainsi hautement exprimé dans les poumons et dans les bronches, alors que le transcrit de CLC n'est que très faiblement détectable (de Bovis *et al*, 2005). Le CLF pourrait donc être impliqué dans la formation d'autres cytokines composites.

Enfin, un nouveau syndrome a récemment été décrit qui présente certains symptômes communs avec le syndrome CISS. Les patients souffrant du syndrome SPOAN (pour « Spastic Paraplegia, Optic Atrophy and Neuropathy ») souffrent de scolioses, d'hyperhidrose, et ont des difficultés d'extension des genoux (Macedo-Souza *et al*, 2005). Ce syndrome est associé à une très large région au niveau du locus 11q13 chez l'homme. Cette région génomique comprend une centaine de gènes dont le gène de CLC. Bien que l'ensemble du tableau clinique ne soit pas tout-à-fait commun entre les syndromes CISS et SPOAN, une implication du gène de CLC reste possible dans ce dernier syndrome.

Contrairement aux syndromes et maladies décrits précédemment qui sont dus à une sous expression, voire une absence des cytokines CLC, CNTF ou CLF, la surexpression de ces protéines peut également causer des troubles pathologiques, en particulier des phénomènes inflammatoires et tumoraux. En effet, les essais cliniques de phase II menés pour le traitement de la SLA où une forte dose de CNTF a été administrée, ont démontré des effets secondaires importants dont une inflammation marquée et une perte de poids (Miller *et al*, 1996).

Un des sujets de ce travail de thèse a été d'étudier l'implication de CLC dans le développement du cancer du sein. Comme le LIF et l'OSM ont des fonctions dans les lignées cellulaires de cancer du sein (Douglas *et al*, 1997;

Douglas *et al*, 1998), et que leurs récepteurs sont composés des mêmes chaînes transductrices du signal que le CNTFR, nous avons examiné si des lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que des biopsies de cancer du sein exprimaient simultanément le récepteur au CNTF et ses ligands. Nous avons montré que les lignées cellulaires exprimaient un CNTFR fonctionnel, avec une activation des voies de signalisation JAK/STAT et MAPK. De plus, l'ARN messager de CLC est exprimé de façon ubiquitaire aussi bien dans les lignées que dans les biopsies. La présence de la protéine a été démontrée par Western Blot et par cytométrie de flux sur la lignée MCF-7 grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine. Dans cette lignée, le CNTF et le complexe CLC/CLF induisent une activation efficace de STAT1, STAT3 et de la voie des MAPK. Ces observations démontrent que CLC a un rôle potentiel en tant que facteur de croissance autocrine dans la tumorigénèse. Il a été montré que l'IL-6 pouvait être produite par les cellules de cancer du sein (Crichton *et al*, 1996; Conze *et al*, 2001; Knapfer *et al*, 2004), et sa concentration peut augmenter dans le sérum de patients atteints de cancer du sein (Benoy *et al*, 2002; Bachelot *et al*, 2003; Salgado *et al*, 2003; Bozcuk *et al*, 2004). La présence d'un fort taux d'IL-6 dans le sérum est corrélé avec un mauvais pronostic de survie des patients (Benoy *et al*, 2002; Bachelot *et al*, 2003; Salgado *et al*, 2003; Bozcuk *et al*, 2004). De plus, l'activation constitutive de STAT1 et STAT3 dans le cancer du sein est fréquente (Bravo and Heath, 2000; Turkson and Jove, 2000), et ces deux facteurs de transcription sont également activés par les récepteurs de la famille de l'IL-6 (Peters *et al*, 1998; Bravo and Heath, 2000; Heinrich *et al*, 2003). Il est particulièrement intéressant de tenter d'exploiter la voie de signalisation JAK/STAT pour la découverte de drogues anticancéreuses puisque cette voie est utilisée par de nombreuses cytokines et facteurs de croissance. Des petits modulateurs non peptidiques de ces cytokines offrent un potentiel de facilité de production, de biodisponibilité orale et ont peu d'effets immunogéniques (Seidel *et al*, 2000).

Des études récentes ont démontré que l'activation constitutive de STAT3 pouvait avoir un rôle important dans le développement de nombreux cancers (Bromberg *et al*, 1999). Ainsi des antagonistes de STAT3 pourraient être très utiles dans le traitement de certains cancers. En effet, dans des cultures

cellulaires comme dans des modèles animaux, l'activation constitutive de STAT3 seule est suffisante pour induire un phénotype de maladie. De plus, des études ont montré qu'en bloquant la signalisation de STAT3, le phénotype des maladies est inversé. C'est pourquoi les mécanismes moléculaires de l'oncogenèse due à STAT3 doivent être clairement établis (Turkson and Jove, 2000). Une activité anormale des récepteurs physiologiques ou des ligands qui activent la voie de signalisation des STATs tels que CLC/CLF et CNTF, peut induire une activation constitutive de ces facteurs de transcription. L'inhibition de ces récepteurs ou ligands représente donc un moyen de bloquer l'activation des STATs. Par exemple, en mutant les sites de fixation de l'IL-6 pour son récepteur IL-6R $\alpha$ , l'affinité de la cytokine augmente pour son récepteur mais ces modifications abolissent l'activité biologique du complexe (Savino *et al*, 1994). Ces auteurs ont donc produit un antagoniste puissant de l'IL-6 (IL-6mutée) qui permet de bloquer l'activation constitutive de STAT3 dans des cellules de myélome et inhibe la croissance cellulaire (Sporeno *et al*, 1996). Une autre approche thérapeutique permettant de bloquer l'activation constitutive de STAT3 est l'utilisation du trastuzumab (Herceptin®), qui est un anticorps monoclonal humanisé bloquant le récepteur HER2 qui est surexprimé dans le cancer du sein. Donc le blocage de la signalisation induite par le CNTF ou CLC/CLF représente une alternative potentielle dans l'inhibition de STAT3.

Le développement du cancer du sein est en partie régulé par des mécanismes autocrines et paracrines via les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme. Les oestrogènes produits par les cellules du stroma entourant la tumeur agissent pour stimuler la production de facteurs de croissance et des cytokines par les cellules tumorales. Nous avons analysé le rôle de CLC/CLF et du CNTF dans le développement du cancer du sein. Nos résultats suggèrent une corrélation entre l'expression du CNTFR et des récepteurs aux oestrogènes. Le potentiel de l'inhibition de la voie de signalisation du CNTFR comme thérapie adjuvante pour le cancer du sein pourrait être restreinte à la phase dépendante des facteurs de croissance et des hormones qui permettent l'initiation du développement de la tumeur. De plus, CLC pourrait avoir une action différente de celle de l'IL-6 qui peut être exprimée par les cellules présentant une résistance multiple au traitement (Conze *et al*, 2001).

Nos connaissances des fonctions précises de CLC restent encore fragmentaires. Sachant que les patients atteints du syndrome CISS ont une perception de la douleur altérée et des problèmes de scoliose, il est envisageable de penser que CLC, produite par les tumeurs de sein, a des effets exocrines et contribue à la destruction des os liée au cancer et à la douleur. Des études chez des rongeurs indiquent que CLC, comme CNTF, induit une perte de poids (Senaldi *et al*, 1999) et pourrait avoir un rôle dans le syndrome d'anorexie et de cachexie cancéreuse comme l'IL-6 (Kurebayashi, 2000). Enfin, chez la souris, CLC semble jouer un rôle dans le contrôle circadien de l'activité locomotrice des animaux (Kraves and Weitz, 2006). CLC produite par les tumeurs pourrait alors être un facteur impliqué dans l'altération du système circadien observée chez les patients atteints de cancer du sein (Mormont and Levi, 1997; Keith *et al*, 2001).

La croissance initiale des cellules de cancer du sein est vraisemblablement régulée par un équilibre entre les hormones stéroïdiennes, les membres de la famille EGF, IGF et FGF, et les cytokines telles que l'IL-6 et CLC/CLF. L'expression de ces cytokines et de leurs récepteurs pourrait jouer un rôle dans la biologie des cellules de sein normales ou tumorales ; ainsi, de nouvelles opportunités de traitement sont envisageables (Mayer, 2005). Le blocage de la voie de signalisation des JAK/STAT par l'intermédiaire du blocage de CLC pourrait avoir des effets à plusieurs niveaux : au niveau neurologique (rôle dans la perception de la douleur), en cancérologie (rôle autocrine et paracrine de CLC dans le cancer du sein) et éventuellement un rôle au niveau du système immunitaire (rôle potentiel de CLC sur les lymphocytes B). La compréhension de la fonction de CLC et son éventuelle inactivation représentent un enjeu thérapeutique majeur dans le traitement de maladies comme le cancer, ou dans l'élaboration de nouveaux agents analgésiques.

## Conclusion

La génération d'un signal biologique en réponse à une cytokine comporte de nombreux niveaux de régulation depuis la fixation du ligand sur son récepteur jusqu'à la réponse biologique en passant par l'activation des voies de transduction du signal cytoplasmique et nucléaire et par l'inhibition de cette cascade. Durant ma thèse, nous avons étudié le rôle des deux ligands sécrétés du récepteur au CNTF, CLC et la neuropoïétine. Ces cytokines ont été mises en évidence récemment et peu de données sur leurs fonctions sont disponibles. Nous avons donc initié la génération de souris transgéniques où les gènes de ces cytokines seront inactivés. Pour CLC, l'exon 3 du gène a été flanqué des sites LoxP pour obtenir un modèle de souris Knock-In inducible. Pour inactiver la neuropoïétine, comme elle se retrouve sous forme de pseudogène chez l'Homme, un Knock-Out classique a été choisi. La mise en évidence des voies de signalisation empruntées par la neuropoïétine nous a permis de rendre compte de sa redondance avec le CNTF. Elle entraîne également la synthèse de neuropeptides pouvant être impliqués dans la différenciation neuronale. Quant à CLC, son expression dans le cancer du sein a été étudiée et nous avons montré dans des modèles de culture *in vitro* que cette cytokine pourrait avoir un rôle autocrine dans le développement du cancer du sein. D'après les symptômes des patients atteints du syndrome CISS et les résultats obtenus dans le cancer du sein, il sera intéressant de tester cette molécule dans des essais de perception de la douleur. Si les essais thérapeutiques avec CNTF ont eu des résultats mitigés, la compréhension de la fonction des ligands alternatifs du CNTFR permettra éventuellement de palier aux effets secondaires observés avec le CNTF. En effet, la pléiotropie des molécules de cette famille rend difficile leur analyse en thérapeutique en partie à cause de leur signalisation intracellulaire commune. L'utilisation de molécules agonistes, antagonistes ou d'anticorps monoclonaux neutralisant spécifiquement ces cytokines pourrait représenter un espoir thérapeutique.



## Bibliographie

- Abremski, K., Hoess, R. & Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**, 1301-1311.
- Adler, R., Landa, K.B., Manthorpe, M. & Varon, S. (1979). Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* **204**, 1434-1436.
- Aebischer, P., Schluep, M., Deglon, N., Joseph, J.M., Hirt, L., Heyd, B., Goddard, M., Hammang, J.P., Zurn, A.D., Kato, A.C., Regli, F. & Baetge, E.E. (1996). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* **2**, 696-699.
- Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M. & Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* **77**, 63-71.
- Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* **54**, 1-78.
- Al-Gazali, L.I., Ravenscroft, A., Feng, A., Shubbar, A., Al-Saggaf, A. & Haas, D. (2003). Stuve-Wiedemann syndrome in children surviving infancy: clinical and radiological features. *Clin Dysmorphol* **12**, 1-8.
- Alexander, W.S., Rakar, S., Robb, L., Farley, A., Willson, T.A., Zhang, J.G., Hartley, L., Kikuchi, Y., Kojima, T., Nomura, H., Hasegawa, M., Maeda, M., Fabri, L., Jachno, K., Nash, A., Metcalf, D., Nicola, N.A. & Hilton, D.J. (1999a). Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* **9**, 605-608.
- Alexander, W.S., Starr, R., Metcalf, D., Nicholson, S.E., Farley, A., Elefanty, A.G., Brysha, M., Kile, B.T., Richardson, R., Baca, M., Zhang, J.G., Willson, T.A., Viney, E.M., Sprigg, N.S., Rakar, S., Corbin, J., Mifsud, S., DiRago, L., Cary, D., Nicola, N.A. & Hilton, D.J. (1999b). Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* **66**, 588-592.
- Allan, E.H., Hilton, D.J., Brown, M.A., Evely, R.S., Yumita, S., Metcalf, D., Gough, N.M., Ng, K.W., Nicola, N.A. & Martin, T.J. (1990). Osteoblasts display receptors for and responses to leukemia-inhibitory factor. *J Cell Physiol* **145**, 110-119.
- Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* **4**, 197-201.
- Anderson, K.D., Panayotatos, N., Corcoran, T.L., Lindsay, R.M. & Wiegand, S.J. (1996). Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7346-7351.
- Arakawa, Y., Sendtner, M. & Thoenen, H. (1990). Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* **10**, 3507-3515.
- Arnason, B.G. (1999). Treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Biomed Pharmacother* **53**, 344-350.
- Arnon, R. & Aharoni, R. (2004). Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**, 14593-14598.
- Arts, J., Kuiper, G.G., Janssen, J.M., Gustafsson, J.A., Lowik, C.W., Pols, H.A. & van Leeuwen, J.P. (1997). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology* **138**, 5067-5070.
- Arzt, E. (2001). gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *J Clin Invest* **108**, 1729-1733.

- Asgeirsson, K.S., Olafsdottir, K., Jonasson, J.G. & Ogmundsdottir, H.M. (1998). The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* **10**, 720-728.
- Auernhammer, C.J., Isele, N.B., Kopp, F.B., Spoettl, G., Cengic, N., Weber, M.M., Senaldi, G. & Engelhardt, D. (2003). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) stimulates corticotroph function via a signal transducer and activator of transcription-dependent mechanism negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *Endocrinology* **144**, 1202-1210.
- Auernhammer, C.J., Kopp, F.B., Vlotides, G., Dorn, F., Isele, N.B., Spoettl, G., Cengic, N., Weber, M.M., Senaldi, G. & Engelhardt, D. (2004). Comparative study of gp130 cytokine effects on corticotroph AtT-20 cells--redundancy or specificity of neuroimmunoendocrine modulators? *Neuroimmunomodulation* **11**, 224-232.
- Auernhammer, C.J. & Melmed, S. (2001). The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* **108**, 1735-1740.
- Bachelot, T., Ray-Coquard, I., Menetrier-Caux, C., Rastkha, M., Duc, A. & Blay, J.Y. (2003). Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* **88**, 1721-1726.
- Bachoud-Levi, A.C., Deglon, N., Nguyen, J.P., Bloch, J., Bourdet, C., Winkel, L., Remy, P., Goddard, M., Lefaucheur, J.P., Brugieres, P., Baudic, S., Cesaro, P., Peschanski, M. & Aebischer, P. (2000). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* **11**, 1723-1729.
- Balakrishnan, A., Yang, J., Beattie, C.W., Das Gupta, T.K. & Nandi, S. (1987). Estrogen receptor in dissociated and cultured human breast fibroadenoma epithelial cells. *Cancer Lett* **34**, 233-242.
- Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M. & Raff, M.C. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* **118**, 283-295.
- Basolo, F., Fiore, L., Fontanini, G., Conaldi, P.G., Calvo, S., Falcone, V. & Toniolo, A. (1996). Expression of and response to interleukin 6 (IL6) in human mammary tumors. *Cancer Res* **56**, 3118-3122.
- Baubonis, W. & Sauer, B. (1993). Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* **21**, 2025-2029.
- Bazan, J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6934-6938.
- Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B., Henshaw, R., Rosen, B. & Hyman, B.T. (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem* **61**, 1147-1150.
- Beal, M.F., Ferrante, R.J., Swartz, K.J. & Kowall, N.W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* **11**, 1649-1659.
- Benigni, F., Fantuzzi, G., Sacco, S., Sironi, M., Pozzi, P., Dinarello, C.A., Sipe, J.D., Poli, V., Cappelletti, M., Paonessa, G., Pennica, D., Panayotatos, N. & Ghezzi, P. (1996). Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* **87**, 1851-1854.
- Benoy, I., Salgado, R., Colpaert, C., Weytjens, R., Vermeulen, P.B. & Dirix, L.Y. (2002). Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* **2**, 311-315.
- Berger, C.N., Tan, S.S. & Sturm, K.S. (1994). Simultaneous detection of beta-galactosidase activity and surface antigen expression in viable haematopoietic cells. *Cytometry* **17**, 216-223.
- Blanchard, F., Wang, Y., Kinzie, E., Duplomb, L., Godard, A. & Baumann, H. (2001). Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* **276**, 47038-47045.

- Bluher, S., Moschos, S., Bullen, J., Jr., Kokkotou, E., Maratos-Flier, E., Wiegand, S.J., Sleeman, M.W. & Mantzoros, C.S. (2004). Ciliary neurotrophic factorAx15 alters energy homeostasis, decreases body weight, and improves metabolic control in diet-induced obese and UCP1-DTA mice. *Diabetes* **53**, 2787-2796.
- Bonni, A., Frank, D.A., Schindler, C. & Greenberg, M.E. (1993). Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science* **262**, 1575-1579.
- Borasio, G.D. & Miller, R.G. (2001). Clinical characteristics and management of ALS. *Semin Neurol* **21**, 155-166.
- Boulton, T.G., Stahl, N. & Yancopoulos, G.D. (1994). Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* **269**, 11648-11655.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2488.
- Bozcuk, H., Uslu, G., Samur, M., Yildiz, M., Ozben, T., Ozdogan, M., Artac, M., Altunbas, H., Akan, I. & Savas, B. (2004). Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cytokine* **27**, 58-65.
- Braun, T., Bober, E., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. & Arnold, H.H. (1994). MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development* **120**, 3083-3092.
- Bravo, J. & Heath, J.K. (2000). Receptor recognition by gp130 cytokines. *Embo J* **19**, 2399-2411.
- Bromberg, J. & Darnell, J.E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-2473.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D. & Darnell, J.E., Jr. (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7673-7678.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. & Darnell, J.E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N.W. & Beal, M.F. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7105-7109.
- Brouillet, E., Peschanski, M. & Hantraye, P. (2000). Du gène à la maladie: la mort neuronale dans la maladie de Huntington. *m/s* **16**, 57-63.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. & Stewart, A.F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* **16**, 657-662.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P.O., Rossi, F. & Stewart, A.F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* **24**, 4256-4262.
- Burger, R., Bakker, F., Guenther, A., Baum, W., Schmidt-Arras, D., Hideshima, T., Tai, Y.T., Shringarpure, R., Catley, L., Senaldi, G., Gramatzki, M. & Anderson, K.C. (2003). Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br J Haematol* **123**, 869-878.
- Capecchi, M.R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* **5**, 70-76.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439.
- Cazillis, M., Gonzalez, B.J., Billardon, C., Lombet, A., Fraichard, A., Samarut, J., Gressens, P., Vaudry, H. & Rostene, W. (2004). VIP and PACAP induce selective

- neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur J Neurosci* **19**, 798-808.
- Chang, J., Powles, T.J., Ashley, S.E., Gregory, R.K., Tidy, V.A., Treleaven, J.G. & Singh, R. (1996). The effect of tamoxifen and hormone replacement therapy on serum cholesterol, bone mineral density and coagulation factors in healthy postmenopausal women participating in a randomised, controlled tamoxifen prevention study. *Ann Oncol* **7**, 671-675.
- Chang, L. & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chiu, J.J., Sgagias, M.K. & Cowan, K.H. (1996). Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **2**, 215-221.
- Chodosh, L.A., D'Cruz, C.M., Gardner, H.P., Ha, S.I., Marquis, S.T., Rajan, J.V., Stairs, D.B., Wang, J.Y. & Wang, M. (1999). Mammary gland development, reproductive history, and breast cancer risk. *Cancer Res* **59**, 1765-1771s; discussion 1771s-1772s.
- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V. & Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957-962.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. & Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278**, 1803-1805.
- Clevenger, C.V. (2004). Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* **165**, 1449-1460.
- Cohen, P., Miyazaki, M., Socci, N.D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A.A., Sharma, R., Hudgins, L.C., Ntambi, J.M. & Friedman, J.M. (2002). Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* **297**, 240-243.
- Coletta, R.D., Jedlicka, P., Gutierrez-Hartmann, A. & Ford, H.L. (2004). Transcriptional control of the cell cycle in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 39-53.
- Conneally, P.M. (1984). Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am J Hum Genet* **36**, 506-526.
- Conover, J.C., Ip, N.Y., Poueymirou, W.T., Bates, B., Goldfarb, M.P., DeChiara, T.M. & Yancopoulos, G.D. (1993). Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Development* **119**, 559-565.
- Conze, D., Weiss, L., Regen, P.S., Bhushan, A., Weaver, D., Johnson, P. & Rincon, M. (2001). Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* **61**, 8851-8858.
- Crichton, M.B., Nichols, J.E., Zhao, Y., Bulun, S.E. & Simpson, E.R. (1996). Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* **118**, 215-220.
- D'Souza, S.D., Alinauskas, K.A. & Antel, J.P. (1996). Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res* **43**, 289-298.
- Dagoneau, N., Scheffer, D., Huber, C., Al-Gazali, L.I., Di Rocco, M., Godard, A., Martinovic, J., Raas-Rothschild, A., Sigaudy, S., Unger, S., Nicole, S., Fontaine, B., Taupin, J.L., Moreau, J.F., Superti-Furga, A., Le Merrer, M., Bonaventure, J., Munnich, A., Legeai-Mallet, L. & Cormier-Daire, V. (2004). Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet* **74**, 298-305.
- Dallner, C., Woods, A.G., Deller, T., Kirsch, M. & Hofmann, H.D. (2002). CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* **37**, 374-378.
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.

- Davis, S., Aldrich, T.H., Ip, N.Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P.S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H. & et al. (1993a). Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* **259**, 1736-1739.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1993b). LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* **260**, 1805-1808.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Valenzuela, D.M., Wong, V.V., Furth, M.E., Squinto, S.P. & Yancopoulos, G.D. (1991). The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* **253**, 59-63.
- de Bovis, B., Derouet, D., Gauchat, J.F., Elson, G., Gascan, H. & Delapeyriere, O. (2005). clc is co-expressed with clf or cntfr in developing mouse muscles. *Cell Commun Signal* **3**, 1.
- De Souza, D., Fabri, L.J., Nash, A., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M. (2002). SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. *Biochemistry* **41**, 9229-9236.
- DeChiara, T.M., Vejsada, R., Poueymirou, W.T., Acheson, A., Suri, C., Conover, J.C., Friedman, B., McClain, J., Pan, L., Stahl, N. & et al. (1995). Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* **83**, 313-322.
- Decker, T. & Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637.
- DeMichele, A., Martin, A.M., Mick, R., Gor, P., Wray, L., Klein-Cabral, M., Athanasiadis, G., Colligan, T., Stadtmauer, E. & Weber, B. (2003). Interleukin-6 -174G-->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* **63**, 8051-8056.
- Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H. & Chevalier, S. (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4827-4832.
- Descotes, F. (2002). Biologie tissulaire: facteurs de pronostic dans le cancer du sein. *Médecine nucléaire* **26**, 31-37.
- Dhingra, K., Sahin, A., Emami, K., Hortobagyi, G.N. & Estrov, Z. (1998). Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in breast cancer: a potential autocrine and paracrine growth regulatory mechanism. *Breast Cancer Res Treat* **48**, 165-174.
- Di Marco, A., Gloaguen, I., Demartis, A., Saggio, I., Graziani, R., Paonessa, G. & Laufer, R. (1997). Agonistic and antagonistic variants of ciliary neurotrophic factor (CNTF) reveal functional differences between membrane-bound and soluble CNTF alpha-receptor. *J Biol Chem* **272**, 23069-23075.
- DiStefano, P.S., Boulton, T.G., Stark, J.L., Zhu, Y., Adryan, K.M., Ryan, T.E. & Lindsay, R.M. (1996). Ciliary neurotrophic factor induces down-regulation of its receptor and desensitization of signal transduction pathways in vivo: non-equivalence with pharmacological activity. *J Biol Chem* **271**, 22839-22846.
- Dittrich, E., Haft, C.R., Muys, L., Heinrich, P.C. & Graeve, L. (1996). A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem* **271**, 5487-5494.
- Dittrich, F., Thoenen, H. & Sendtner, M. (1994). Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol* **35**, 151-163.
- Douglas, A.M., Goss, G.A., Sutherland, R.L., Hilton, D.J., Berndt, M.C., Nicola, N.A. & Begley, C.G. (1997). Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene* **14**, 661-669.

- Douglas, A.M., Grant, S.L., Goss, G.A., Clouston, D.R., Sutherland, R.L. & Begley, C.G. (1998). Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* **75**, 64-73.
- Dragan, Y.P., Fahey, S., Street, K., Vaughan, J., Jordan, V.C. & Pitot, H.C. (1994). Studies of tamoxifen as a promoter of hepatocarcinogenesis in female Fischer F344 rats. *Breast Cancer Res Treat* **31**, 11-25.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. & Levy, D.E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**, 443-450.
- Dusanter-Fourt, I., Mayeux, P. & Gisselbrecht, S. (1994). Transduction du signal par les récepteurs de cytokines. *m/s* **10**, 825-835.
- Eccles, S.A. (2001). The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**, 393-406.
- Elson, G.C., Graber, P., Losberger, C., Herren, S., Gretener, D., Menoud, L.N., Wells, T.N., Kosco-Vilbois, M.H. & Gauchat, J.F. (1998). Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol* **161**, 1371-1379.
- Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A.B., Delneste, Y., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F. & Gascan, H. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* **3**, 867-872.
- Emerich, D.F., Lindner, M.D., Winn, S.R., Chen, E.Y., Frydel, B.R. & Kordower, J.H. (1996). Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* **16**, 5168-5181.
- Emerich, D.F., Winn, S.R., Hantraye, P.M., Peschanski, M., Chen, E.Y., Chu, Y., McDermott, P., Baetge, E.E. & Kordower, J.H. (1997). Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* **386**, 395-399.
- English, A.W. & Schwartz, G. (1995). Both basic fibroblast growth factor and ciliary neurotrophic factor promote the retention of polyneuronal innervation of developing skeletal muscle fibers. *Dev Biol* **169**, 57-64.
- Escary, J.L., Perreau, J., Dumenil, D., Ezine, S. & Brulet, P. (1993). Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* **363**, 361-364.
- Estrov, Z., Samal, B., Lapushin, R., Kellokumpu-Lehtinen, P., Sahin, A.A., Kurzrock, R., Talpaz, M. & Aggarwal, B.B. (1995). Leukemia inhibitory factor binds to human breast cancer cells and stimulates their proliferation. *J Interferon Cytokine Res* **15**, 905-913.
- Ettinger, M.P., Littlejohn, T.W., Schwartz, S.L., Weiss, S.R., McIlwain, H.H., Heymsfield, S.B., Bray, G.A., Roberts, W.G., Heyman, E.R., Stambler, N., Heshka, S., Vicary, C. & Guler, H.P. (2003). Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *Jama* **289**, 1826-1832.
- Fan, S., Ma, Y.X., Wang, C., Yuan, R.Q., Meng, Q., Wang, J.A., Erdos, M., Goldberg, I.D., Webb, P., Kushner, P.J., Pestell, R.G. & Rosen, E.M. (2001). Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* **20**, 77-87.
- Fiering, S., Kim, C.G., Epner, E.M. & Groudine, M. (1993). An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: analysis of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8469-8473.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Wickerham, D.L. & Cronin, W.M. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* **86**, 527-537.

- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D. & Florkiewicz, E. (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* **162**, 388-399.
- Forger, N.G., Prevette, D., deLapeyriere, O., de Bovis, B., Wang, S., Bartlett, P. & Oppenheim, R.W. (2003). Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* **23**, 8854-8858.
- Forger, N.G., Roberts, S.L., Wong, V. & Breedlove, S.M. (1993). Ciliary neurotrophic factor maintains motoneurons and their target muscles in developing rats. *J Neurosci* **13**, 4720-4726.
- Franke, W.W., Schmid, E., Winter, S., Osborn, M. & Weber, K. (1979). Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res* **123**, 25-46.
- Friedman, B., Scherer, S.S., Rudge, J.S., Helgren, M., Morrissey, D., McClain, J., Wang, D.Y., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M. & et al. (1992). Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* **9**, 295-305.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A. & Jove, R. (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 2499-2513.
- Garnier-Suillerot, A., Marbeuf-Gueye, C., Salerno, M., Loetchutinat, C., Fokt, I., Krawczyk, M., Kowalczyk, T. & Priebe, W. (2001). Analysis of drug transport kinetics in multidrug-resistant cells: implications for drug action. *Curr Med Chem* **8**, 51-64.
- Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L. & Mosley, B. (1994). Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1119-1123.
- Genain, C.P., Abel, K., Belmar, N., Villinger, F., Rosenberg, D.P., Linington, C., Raine, C.S. & Hauser, S.L. (1996). Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. *Science* **274**, 2054-2057.
- Giess, R., Goetz, R., Schrank, B., Ochs, G., Sendtner, M. & Toyka, K. (1998). Potential implications of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve* **21**, 236-238.
- Giess, R., Maurer, M., Linker, R., Gold, R., Warmuth-Metz, M., Toyka, K.V., Sendtner, M. & Rieckmann, P. (2002). Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol* **59**, 407-409.
- Gilad, Y., Man, O., Paabo, S. & Lancet, D. (2003). Human specific loss of olfactory receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3324-3327.
- Gisselbrecht, S. (1999). The CIS/SOCS proteins: a family of cytokine-inducible regulators of signaling. *Eur Cytokine Netw* **10**, 463-470.
- Gloaguen, I., Costa, P., Demartis, A., Lazzaro, D., Di Marco, A., Graziani, R., Paonessa, G., Chen, F., Rosenblum, C.I., Van der Ploeg, L.H., Cortese, R., Ciliberto, G. & Laufer, R. (1997). Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6456-6461.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L. & Jones, K.R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* **22**, 6309-6314.
- Gotoh, N., Tojo, A. & Shibuya, M. (1996). A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *Embo J* **15**, 6197-6204.

- Gotoh, N., Toyoda, M. & Shibuya, M. (1997). Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol* **17**, 1824-1831.
- Grant, M.P., Francis, N.J. & Landis, S.C. (1995). The role of acetylcholine in regulating secretory responsiveness in rat sweat glands. *Mol Cell Neurosci* **6**, 32-42.
- Gressens, P., Paindaveine, B., Hill, J.M., Brenneman, D.E. & Evrard, P. (1997). Growth factor properties of VIP during early brain development. Whole embryo culture and in vivo studies. *Ann N Y Acad Sci* **814**, 152-160.
- Groth, A.C., Olivares, E.C., Thyagarajan, B. & Calos, M.P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5995-6000.
- Group, A.C.T.S. (1996). A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology* **46**, 1244-1249.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-106.
- Guillet, C., Auguste, P., Mayo, W., Kreher, P. & Gascan, H. (1999). Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci* **19**, 1257-1262.
- Gupta, S.K., Altares, M., Benoit, R., Riopelle, R.J., Dunn, R.J. & Richardson, P.M. (1992). Preparation and biological properties of native and recombinant ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* **23**, 481-490.
- Haan, C., Heinrich, P.C. & Behrmann, I. (2002). Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem J* **361**, 105-111.
- Habecker, B.A., Pennica, D. & Landis, S.C. (1995). Cardiotrophin-1 is not the sweat gland-derived differentiation factor. *Neuroreport* **7**, 41-44.
- Habecker, B.A., Symes, A.J., Stahl, N., Francis, N.J., Economides, A., Fink, J.S., Yancopoulos, G.D. & Landis, S.C. (1997). A sweat gland-derived differentiation activity acts through known cytokine signaling pathways. *J Biol Chem* **272**, 30421-30428.
- Hanavadi, S., Martin, T.A., Watkins, G., Mansel, R.E. & Jiang, W.G. (2006). Expression of interleukin 11 and its receptor and their prognostic value in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* **13**, 802-808.
- Hawley, R.G. (1994). Hematopathology of interleukin 6-type cytokines. *Stem Cells* **12 Suppl 1**, 155-171.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G. & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334**, 297-314.
- Helgren, M.E., Squinto, S.P., Davis, H.L., Parry, D.J., Boulton, T.G., Heck, C.S., Zhu, Y., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M. & DiStefano, P.S. (1994). Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* **76**, 493-504.
- Hill, J.M., Mehnert, J., McCune, S.K. & Brenneman, D.E. (2002). Vasoactive intestinal peptide regulation of nerve growth factor in the embryonic mouse. *Peptides* **23**, 1803-1808.
- Hoess, R.H., Ziese, M. & Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3398-3402.
- Hoffmann, V., Pohlau, D., Przuntek, H., Epplen, J.T. & Hardt, C. (2002). A null mutation within the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-gene: implications for susceptibility and disease severity in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun* **3**, 53-55.



- Holtmann, B., Wiese, S., Samsam, M., Grohmann, K., Pennica, D., Martini, R. & Sendtner, M. (2005). Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci* **25**, 1778-1787.
- Hughes, S.M., Lillien, L.E., Raff, M.C., Rohrer, H. & Sendtner, M. (1988). Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* **335**, 70-73.
- Hynes, N.E. & Lane, H.A. (2001). Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**, 141-150.
- Iacopetta, B., Grieu, F. & Joseph, D. (2004). The -174 G/C gene polymorphism in interleukin-6 is associated with an aggressive breast cancer phenotype. *Br J Cancer* **90**, 419-422.
- Ihle, J.N. & Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* **11**, 69-74.
- Indo, Y., Tsuruta, M., Hayashida, Y., Karim, M.A., Ohta, K., Kawano, T., Mitsubuchi, H., Tonoki, H., Awaya, Y. & Matsuda, I. (1996). Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat Genet* **13**, 485-488.
- Ip, N.Y., McClain, J., Barrezueta, N.X., Aldrich, T.H., Pan, L., Li, Y., Wiegand, S.J., Friedman, B., Davis, S. & Yancopoulos, G.D. (1993). The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* **10**, 89-102.
- Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1992). Ciliary neurotrophic factor and its receptor complex. *Prog Growth Factor Res* **4**, 139-155.
- Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1996). The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* **19**, 491-515.
- Jee, S.H., Shen, S.C., Chiu, H.C., Tsai, W.L. & Kuo, M.L. (2001). Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. *Oncogene* **20**, 198-208.
- Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S.X., Schmoll, R. & Woolf, C.J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* **36**, 57-68.
- Jove, R. (2000). Preface: STAT signaling. *Oncogene* **19**, 2466-2467.
- Joyner, A.L. (2001). Gene Targeting : a practical approach. Second edition. *Oxford University Press*.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**, 15-25.
- Kallen, K.J., Grotzinger, J., Lelievre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renne, C., Mullberg, J., Myer zum Buschenfelde, K.H., Gascan, H. & Rose-John, S. (1999). Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. *J Biol Chem* **274**, 11859-11867.
- Kalloniatis, M. & Fletcher, E.L. (2004). Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clin Exp Optom* **87**, 65-80.
- Kanki, H., Suzuki, H. & Itohara, S. (2006). High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp Anim* **55**, 137-141.
- Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H. & Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* **1**, 165-170.
- Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., Pfeffer, K. & Muller, M. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* **13**, 549-560.

- Katzenellenbogen, B.S., Montano, M.M., Ediger, T.R., Sun, J., Ekena, K., Lazennec, G., Martini, P.G., McInerney, E.M., Delage-Mourroux, R., Weis, K. & Katzenellenbogen, J.A. (2000). Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res* **55**, 163-193; discussion 194-165.
- Kaur, N., Wohlueter, A.L. & Halvorsen, S.W. (2002). Activation and inactivation of signal transducers and activators of transcription by ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cells. *Cell Signal* **14**, 419-429.
- Keith, L.G., Oleszczuk, J.J. & Laguens, M. (2001). Circadian rhythm chaos: a new breast cancer marker. *Int J Fertil Womens Med* **46**, 238-247.
- Kellokumpu-Lehtinen, P., Talpaz, M., Harris, D., Van, Q., Kurzrock, R. & Estrov, Z. (1996). Leukemia-inhibitory factor stimulates breast, kidney and prostate cancer cell proliferation by paracrine and autocrine pathways. *Int J Cancer* **66**, 515-519.
- Kemp, B.E., Stapleton, D., Campbell, D.J., Chen, Z.P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J.J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I.G., Iseli, T., Michell, B.J. & Witters, L.A. (2003). AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* **31**, 162-168.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R. & Murray, J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* **9**, 413-421.
- Kim, C.G., Epner, E.M., Forrester, W.C. & Groudine, M. (1992). Inactivation of the human beta-globin gene by targeted insertion into the beta-globin locus control region. *Genes Dev* **6**, 928-938.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243-1254.
- Knappskog, P.M., Majewski, J., Livneh, A., Nilsen, P.T., Bringsli, J.S., Ott, J. & Boman, H. (2003). Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet* **72**, 375-383.
- Knupfer, H., Schmidt, R., Stanitz, D., Brauckhoff, M., Schonfelder, M. & Preiss, R. (2004). CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast* **13**, 28-34.
- Kobayashi, H. & Mizisin, A.P. (2000). CNTFR alpha alone or in combination with CNTF promotes macrophage chemotaxis in vitro. *Neuropeptides* **34**, 338-347.
- Kokoeva, M.V., Yin, H. & Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* **310**, 679-683.
- Kolot, M., Silberstein, N. & Yagil, E. (1999). Site-specific recombination in mammalian cells expressing the Int recombinase of bacteriophage HK022. *Mol Biol Rep* **26**, 207-213.
- Kraves, S. & Weitz, C.J. (2006). A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* **9**, 212-219.
- Kress, C., Vandormael-Pournin, S., Baldacci, P., Cohen-Tannoudji, M. & Babinet, C. (1998). Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. *Mamm Genome* **9**, 998-1001.
- Krueger, J., Ray, A., Tamm, I. & Sehgal, P.B. (1991). Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. *J Cell Biochem* **45**, 327-334.
- Kubista, M., Rosner, M., Kubista, E., Bernaschek, G. & Hengstschlager, M. (2002). Brca1 regulates in vitro differentiation of mammary epithelial cells. *Oncogene* **21**, 4747-4756.
- Kuhlmann, T., Remington, L., Cognet, I., Bourbonniere, L., Zehntner, S., Guilhot, F., Herman, A., Guay-Giroux, A., Antel, J.P., Owens, T. & Gauchat, J.F. (2006). Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* **169**, 584-598.
- Kühn, R. & Schwenk, F. (2001). Conditional Knockout Mice. *Methods in Molecular Biology* **209**, 159-185.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and

- transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863-870.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. & Gustafsson, J.A. (1998a). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263.
- Kuiper, G.G., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I. & Gustafsson, J.A. (1998b). The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* **19**, 253-286.
- Kumar, G., Gupta, S., Wang, S. & Nel, A.E. (1994). Involvement of Janus kinases, p52shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6- induced mitogen-activated protein kinase cascade of a growth-responsive B cell line. *J Immunol* **153**, 4436-4447.
- Kurebayashi, J. (2000). Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications. *Breast Cancer* **7**, 124-129.
- Lambert, P.D., Anderson, K.D., Sleeman, M.W., Wong, V., Tan, J., Hajarunguru, A., Corcoran, T.L., Murray, J.D., Thabet, K.E., Yancopoulos, G.D. & Wiegand, S.J. (2001). Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4652-4657.
- Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G.C., Gauchat, J.F. & Gascan, H. (2001). Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem* **276**, 22476-22484.
- Levison, S.W., Ducceschi, M.H., Young, G.M. & Wood, T.L. (1996). Acute exposure to CNTF in vivo induces multiple components of reactive gliosis. *Exp Neurol* **141**, 256-268.
- Li, M., Sendtner, M. & Smith, A. (1995). Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* **378**, 724-727.
- Li, T., Vallada, H., Bell, R., Liu, X., Xie, T. & Collier, D.A. (1996). CNTF and psychiatric disorders. *Nat Genet* **13**, 143-144.
- Lillien, L.E., Sendtner, M., Rohrer, H., Hughes, S.M. & Raff, M.C. (1988). Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. *Neuron* **1**, 485-494.
- Lin, L.F., Mismar, D., Lile, J.D., Armes, L.G., Butler, E.T., 3rd, Vannice, J.L. & Collins, F. (1989). Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* **246**, 1023-1025.
- Linker, R.A., Maurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K.V., Sendtner, M. & Gold, R. (2002). CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* **8**, 620-624.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D. & Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10626-10631.
- Liu, J., Spence, M.J., Wallace, P.M., Forcier, K., Hellstrom, I. & Vestal, R.E. (1997). Oncostatin M-specific receptor mediates inhibition of breast cancer cell growth and down-regulation of the c-myc proto-oncogene. *Cell Growth Differ* **8**, 667-676.
- Louis, J.C., Magal, E., Burnham, P. & Varon, S. (1993a). Cooperative effects of ciliary neurotrophic factor and norepinephrine on tyrosine hydroxylase expression in cultured rat locus coeruleus neurons. *Dev Biol* **155**, 1-13.
- Louis, J.C., Magal, E., Takayama, S. & Varon, S. (1993b). CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* **259**, 689-692.
- Luftner, D., Pollmann, D., Schildhauer, S., Schouli, J. & Possinger, K. (2005). Perspectives of immunotherapy in metastatic breast cancer. *Anticancer Res* **25**, 4599-4604.

- Lutticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T. & et al. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**, 89-92.
- Macedo-Souza, L.I., Kok, F., Santos, S., Amorim, S.C., Starling, A., Nishimura, A., Lezirovitz, K., Lino, A.M. & Zatz, M. (2005). Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Ann Neurol* **57**, 730-737.
- Mak, T.W. (1998). The gene Knockout Facts Book. *Academic, San Diego, CA*.
- Man, D., He, W., Sze, K.H., Gong, K., Smith, D.K., Zhu, G. & Ip, N.Y. (2003). Solution structure of the C-terminal domain of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor and ligand free associations among components of the CNTF receptor complex. *J Biol Chem* **278**, 23285-23294.
- Marine, J.C., McKay, C., Wang, D., Topham, D.J., Parganas, E., Nakajima, H., Pendeville, H., Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A. & Ihle, J.N. (1999). SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* **98**, 617-627.
- Martinou, J.C., Martinou, I. & Kato, A.C. (1992). Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. *Neuron* **8**, 737-744.
- Marz, P., Otten, U. & Rose-John, S. (1999). Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* **11**, 2995-3004.
- Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G. & Thoenen, H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* **365**, 27-32.
- Mayer, I.A. (2005). Targeting cytokine receptors and pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Res* **126**, 243-262.
- McKeage, K. & Perry, C.M. (2002). Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* **62**, 209-243.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M. & Schreiber, R.D. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* **84**, 431-442.
- Meyers, E.N., Lewandoski, M. & Martin, G.R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* **18**, 136-141.
- Miller, R.G., Bryan, W.W., Dietz, M.A., Munsat, T.L., Petajan, J.H., Smith, S.A. & Goodpasture, J.C. (1996). Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **47**, 1329-1331.
- Minegishi, Y., Saito, M., Morio, T., Watanabe, K., Agematsu, K., Tsuchiya, S., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Kaneko, H., Kondo, N., Tsuge, I., Yachie, A., Sakiyama, Y., Iwata, T., Bessho, F., Ohishi, T., Joh, K., Imai, K., Kogawa, K., Shinohara, M., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Pasic, S., Abinun, M., Ochs, H.D., Renner, E.D., Jansson, A., Belohradsky, B.H., Metin, A., Shimizu, N., Mizutani, S., Miyawaki, T., Nonoyama, S. & Karasuyama, H. (2006). Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* **25**, 745-755.
- Mittoux, V., Joseph, J.M., Conde, F., Palfi, S., Dautry, C., Poyot, T., Bloch, J., Deglon, N., Ouay, S., Nimchinsky, E.A., Brouillet, E., Hof, P.R., Peschanski, M., Aebischer, P. & Hantraye, P. (2000). Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* **11**, 1177-1187.
- Mohand-Said, S., Hicks, D., Dreyfus, H. & Sahel, J.A. (2000). Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch Ophthalmol* **118**, 807-811.

- Mohand-Said, S., Hicks, D., Leveillard, T., Picaud, S., Porto, F. & Sahel, J.A. (2001). Rod-cone interactions: developmental and clinical significance. *Prog Retin Eye Res* **20**, 451-467.
- Monville, C., Couplier, M., Conti, L., De-Fraja, C., Dreyfus, P., Fages, C., Riche, D., Tardy, M., Cattaneo, E. & Peschanski, M. (2001). Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. *Mol Cell Neurosci* **17**, 373-384.
- Monville, C. & Peschanski, M. (2001). Le CNTF, une cytokine gliale au secours des neurones. *m/s* **17**, 568-576.
- Mormont, M.C. & Levi, F. (1997). Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int J Cancer* **70**, 241-247.
- Motro, B., Itin, A., Sachs, L. & Keshet, E. (1990). Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3092-3096.
- Mueller, H., Flury, N., Eppenberger-Castori, S., Kueng, W., David, F. & Eppenberger, U. (2000). Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer* **89**, 384-388.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. & Kishimoto, T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* **260**, 1808-1810.
- Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11349-11353.
- Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, A.K., Pirity, M. & Rossant, J. (1998). Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol* **8**, 661-664.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. & Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929.
- Naka, T., Nishimoto, N. & Kishimoto, T. (2002). The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**, S233-242.
- Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T. & Taga, T. (1994). Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2285-2289.
- Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U. & Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**, 397-409.
- Nicholson, L.F., Faull, R.L., Waldvogel, H.J. & Dragunow, M. (1995). GABA and GABAA receptor changes in the substantia nigra of the rat following quinolinic acid lesions in the striatum closely resemble Huntington's disease. *Neuroscience* **66**, 507-521.
- Nicholson, S.E., De Souza, D., Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., Metcalf, D., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6493-6498.
- Nicholson, S.E. & Hilton, D.J. (1998). The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* **63**, 665-668.
- O'Brien, C.A. & Manolagas, S.C. (1997). Isolation and characterization of the human gp130 promoter. Regulation by STATS. *J Biol Chem* **272**, 15003-15010.
- O'Shea, J.J., Gadina, M. & Schreiber, R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-131.
- Olson, E.N., Arnold, H.H., Rigby, P.W. & Wold, B.J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* **85**, 1-4.

- Olsson, H. (2000). Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**, 345-350.
- Oppenheim, R.W., Prevette, D., Yin, Q.W., Collins, F. & MacDonald, J. (1991). Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* **251**, 1616-1618.
- Osterlund, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A. & Hurd, Y.L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **54**, 175-180.
- Ott, V., Fasshauer, M., Dalski, A., Klein, H.H. & Klein, J. (2002). Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. *J Endocrinol* **173**, R1-8.
- Ozog, M.A., Bernier, S.M., Bates, D.C., Chatterjee, B., Lo, C.W. & Naus, C.C. (2004). The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Mol Biol Cell* **15**, 4761-4774.
- Panayotatos, N., Everdeen, D., Liten, A., Somogyi, R. & Acheson, A. (1994). Recombinant human CNTF receptor alpha: production, binding stoichiometry, and characterization of its activity as a diffusible factor. *Biochemistry* **33**, 5813-5818.
- Panayotatos, N., Radziejewska, E., Acheson, A., Pearsall, D., Thadani, A. & Wong, V. (1993). Exchange of a single amino acid interconverts the specific activity and gel mobility of human and rat ciliary neurotrophic factors. *J Biol Chem* **268**, 19000-19003.
- Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A.L., Toniatti, C. & Ciliberto, G. (1995). Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *Embo J* **14**, 1942-1951.
- Pardridge, W.M., Golden, P.L., Kang, Y.S. & Bickel, U. (1997). Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem* **68**, 1278-1285.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G. & Ihle, J.N. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385-395.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M. & Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**, 529-539.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320-325.
- Penn, R.D., Kroin, J.S., York, M.M. & Cedarbaum, J.M. (1997). Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* **40**, 94-99; discussion 99-100.
- Perret, D., Guillet, C., Elson, G., Froger, J., Plun-Favreau, H., Rousseau, F., Chabbert, M., Gauchat, J.F. & Gascan, H. (2004). Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFRalpha composite cytokines. *J Biol Chem* **279**, 43961-43970.
- Peters, M., Muller, A.M. & Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* **92**, 3495-3504.
- Pettinelli, C.B. & McFarlin, D.E. (1981). Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* **127**, 1420-1423.
- Pham, C.T., MacIvor, D.M., Hug, B.A., Heusel, J.W. & Ley, T.J. (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13090-13095.
- Piccart, M., Dochy, E. & Cardoso, F. (2003). [News in the medical treatment of breast cancer]. *Bull Cancer* **90**, 46-52.

- Plun-Favreau, H., Elson, G., Chabbert, M., Froger, J., deLapeyriere, O., Lelievre, E., Guillet, C., Hermann, J., Gauchat, J.F., Gascan, H. & Chevalier, S. (2001). The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J* **20**, 1692-1703.
- Polyak, K. (2001). On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* **1552**, 1-13.
- Pradat, P.F. & Bruneteau, G. (2006a). [Classical and atypical clinical features in amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* **162 Spec No 2**, 4S17-14S24.
- Pradat, P.F. & Bruneteau, G. (2006b). [Clinical characteristics of ALS subsets]. *Rev Neurol (Paris)* **162 Spec No 2**, 4S29-24S33.
- Prince, V.E. & Pickett, F.B. (2002). Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet* **3**, 827-837.
- Purohit, A., Newman, S.P. & Reed, M.J. (2002). The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* **4**, 65-69.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J. & Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* **98**, 600-603.
- Raju, S.V., Zheng, M., Schuleri, K.H., Phan, A.C., Bedja, D., Saraiva, R.M., Yiginer, O., Vandegaer, K., Gabrielson, K.L., O'Donnell C, P., Berkowitz, D.E., Barouch, L.A. & Hare, J.M. (2006). Activation of the cardiac ciliary neurotrophic factor receptor reverses left ventricular hypertrophy in leptin-deficient and leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4222-4227.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. (2003). Pharmacology: Fifth Edition. *Churchill Livingstone*.
- Rao, M.S., Tyrrell, S., Landis, S.C. & Patterson, P.H. (1992). Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons. *Dev Biol* **150**, 281-293.
- Reed, M.J. & Purohit, A. (1997). Breast cancer and the role of cytokines in regulating estrogen synthesis: an emerging hypothesis. *Endocr Rev* **18**, 701-715.
- Reed, M.J. & Purohit, A. (2001). Aromatase regulation and breast cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* **54**, 563-571.
- Reich, N.C. & Liu, L. (2006). Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* **6**, 602-612.
- Rickert, R.C., Roes, J. & Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1317-1318.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R. & Stewart, A.F. (1998). Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J Mol Biol* **284**, 363-384.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E.M., Jr. & Schreiber, R.D. (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* **93**, 373-383.
- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F. & Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* **25**, 139-140.
- Rollmann, S.M., Houck, L.D. & Feldhoff, R.C. (1999). Proteinaceous pheromone affecting female receptivity in a terrestrial salamander. *Science* **285**, 1907-1909.
- Rose-John, S. & Heinrich, P.C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* **300 ( Pt 2)**, 281-290.
- Rosen, E.M., Fan, S., Pestell, R.G. & Goldberg, I.D. (2003). BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol* **196**, 19-41.
- Rousseau, F., Gauchat, J.F., McLeod, J.G., Chevalier, S., Guillet, C., Guilhot, F., Cognet, I., Froger, J., Hahn, A.F., Knappskog, P.M., Gascan, H. & Boman, H. (2006). Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10068-10073.

- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. & Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *Embo J* **9**, 1503-1510.
- Rudland, P.S., Fernig, D.G. & Smith, J.A. (1995). Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomed Pharmacother* **49**, 389-399.
- Russo, I.H. & Russo, J. (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 49-61.
- Salgado, R., Junius, S., Benoy, I., Van Dam, P., Vermeulen, P., Van Marck, E., Huget, P. & Dirix, L.Y. (2003). Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* **103**, 642-646.
- Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Demartis, A., Cabibbo, A., Toniatti, C., Delmastro, P., Altamura, S. & Ciliberto, G. (1994). Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6. *Embo J* **13**, 5863-5870.
- Schmidt-Ott, K.M., Yang, J., Chen, X., Wang, H., Paragas, N., Mori, K., Li, J.Y., Lu, B., Costantini, F., Schiffer, M., Bottinger, E. & Barasch, J. (2005). Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1993-2002.
- Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P.C. & Schaper, F. (2000). SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* **275**, 12848-12856.
- Schooltink, H., Stoyan, T., Roeb, E., Heinrich, P.C. & Rose-John, S. (1992). Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Lett* **314**, 280-284.
- Schuettauf, F., Zurakowski, D., Quinto, K., Varde, M.A., Besch, D., Laties, A., Anderson, R. & Wen, R. (2005). Neuroprotective effects of cardiotrophin-like cytokine on retinal ganglion cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**, 1036-1042.
- Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhart, P., Matthews, V., Grotzinger, J., Rose-John, S. & Kallen, K.J. (2003). Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem* **278**, 9528-9535.
- Schwartzberg, P.L., Goff, S.P. & Robertson, E.J. (1989). Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* **246**, 799-803.
- Schwikardi, M. & Droge, P. (2000). Site-specific recombination in mammalian cells catalyzed by gammadelta resolvase mutants: implications for the topology of episomal DNA. *FEBS Lett* **471**, 147-150.
- Seeley, R.J. (2005). More neurons, less weight. *Nat Med* **11**, 1276-1278.
- Seeley, R.J., Drazen, D.L. & Clegg, D.J. (2004). The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance. *Annu Rev Nutr* **24**, 133-149.
- Seidel, H.M., Lamb, P. & Rosen, J. (2000). Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. *Oncogene* **19**, 2645-2656.
- Selmaj, K.W. & Raine, C.S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* **23**, 339-346.
- Senaldi, G., Stolina, M., Guo, J., Faggioni, R., McCabe, S., Kaufman, S.A., Van, G., Xu, W., Fletcher, F.A., Boone, T., Chang, M.S., Sarmiento, U. & Cattley, R.C. (2002). Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* **168**, 5690-5698.
- Senaldi, G., Varnum, B.C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C.L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W.S., Boone, T. & Chang, M.S. (1999). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11458-11463.
- Sendtner, M., Arakawa, Y., Stockli, K.A., Kreutzberg, G.W. & Thoenen, H. (1991). Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl* **15**, 103-109.
- Sendtner, M., Gotz, R., Holtmann, B., Escary, J.L., Masu, Y., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Brulet, P. & Thoenen, H. (1996). Cryptic physiological trophic support of



- motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol* **6**, 686-694.
- Sendtner, M., Gotz, R., Holtmann, B. & Thoenen, H. (1997). Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* **17**, 6999-7006.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W. & Thoenen, H. (1990). Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* **345**, 440-441.
- Shi, Y., Wang, W., Yourey, P.A., Gohari, S., Zukauskas, D., Zhang, J., Ruben, S. & Alderson, R.F. (1999). Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 132-138.
- Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S., Shibata, S., Asano, Y., Gondo, H., Sekiguchi, K., Nakayama, K., Nakayama, T., Okamura, T., Okamura, S., Niho, Y. & Nakayama, K. (2000). Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* **13**, 561-571.
- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D. & Darnell, J.E., Jr. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* **76**, 821-828.
- Shuai, K. & Liu, B. (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**, 593-605.
- Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 171-176.
- Sieving, P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J., Fullmer, K.R. & Bush, R.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3896-3901.
- Silberstein, G.B. (2001). Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res* **3**, 218-223.
- Sledge, G.W., Jr. (2001). Breast cancer in the clinic: treatments past, treatments future. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**, 487-495.
- Sleeman, M.W., Anderson, K.D., Lambert, P.D., Yancopoulos, G.D. & Wiegand, S.J. (2000). The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* **74**, 265-272.
- Sleeman, M.W., Garcia, K., Liu, R., Murray, J.D., Malinova, L., Moncrieffe, M., Yancopoulos, G.D. & Wiegand, S.J. (2003). Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14297-14302.
- Sotiriou, C., Lacroix, M., Lespagnard, L., Larsimont, D., Paesmans, M. & Body, J.J. (2001). Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases. *Cancer Lett* **169**, 87-95.
- Sporeno, E., Savino, R., Ciapponi, L., Paonessa, G., Cabibbo, A., Lahm, A., Pulkki, K., Sun, R.X., Toniatti, C., Klein, B. & Ciliberto, G. (1996). Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells. *Blood* **87**, 4510-4519.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. & et al. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* **263**, 92-95.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. & Yancopoulos, G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**, 1349-1353.
- Stankoff, B., Aigrot, M.S., Noel, F., Wattilliaux, A., Zalc, B. & Lubetzki, C. (2002). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* **22**, 9221-9227.

- Steinberg, G.R., Watt, M.J., Fam, B.C., Proietto, J., Andrikopoulos, S., Allen, A.M., Febbraio, M.A. & Kemp, B.E. (2006). Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* **147**, 3906-3914.
- Stewart, T., Tsai, S.C., Grayson, H., Henderson, R. & Opelz, G. (1995). Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet* **346**, 796-798.
- Stockli, K.A., Lillien, L.E., Naher-Noe, M., Breitfeld, G., Hughes, R.A., Raff, M.C., Thoenen, H. & Sendtner, M. (1991). Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* **115**, 447-459.
- Stockli, K.A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D. & Thoenen, H. (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* **342**, 920-923.
- Strong, M.J., Kesavapany, S. & Pant, H.C. (2005). The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 649-664.
- Swanborg, R.H. (1995). Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol* **77**, 4-13.
- Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J. & Deguchi, T. (1994). A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* **7**, 79-84.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3801-3804.
- Tao, W., Wen, R., Goddard, M.B., Sherman, S.D., O'Rourke, P.J., Stabila, P.F., Bell, W.J., Dean, B.J., Kauper, K.A., Budz, V.A., Tsiaras, W.G., Acland, G.M., Pearce-Kelling, S., Laties, A.M. & Aguirre, G.D. (2002). Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3292-3298.
- Testa, G., Zhang, Y., Vintersten, K., Benes, V., Pijnappel, W.W., Chambers, I., Smith, A.J., Smith, A.G. & Stewart, A.F. (2003). Engineering the mouse genome with bacterial artificial chromosomes to create multipurpose alleles. *Nat Biotechnol* **21**, 443-447.
- Thoenen, H. (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* **14**, 165-170.
- Thomas, M., Finnegan, C.E., Rogers, K.M., Purcell, J.W., Trimble, A., Johnston, P.G. & Boland, M.P. (2004a). STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **64**, 8357-8364.
- Thomas, T., Gallo, M.A. & Thomas, T.J. (2004b). Estrogen receptors as targets for drug development for breast cancer, osteoporosis and cardiovascular diseases. *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 483-499.
- Tominaga, M. & Caterina, M.J. (2004). Thermosensation and pain. *J Neurobiol* **61**, 3-12.
- Tsokos, M., Scarpa, S., Ross, R.A. & Triche, T.J. (1987). Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix proteins. *Am J Pathol* **128**, 484-496.
- Turkson, J. & Jove, R. (2000). STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* **19**, 6613-6626.
- Uemura, A., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Nakashima, K. & Taga, T. (2002). Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* **18**, 1-7.
- Ulenkate, H.J., Kaal, E.C., Gispens, W.H. & Jennekens, F.G. (1994). Ciliary neurotrophic factor improves muscle fibre reinnervation after facial nerve crush in young rats. *Acta Neuropathol* **88**, 558-564.
- Vlotides, G., Zitzmann, K., Hengge, S., Engelhardt, D., Stalla, G.K. & Auernhammer, C.J. (2004). Expression of novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3 (NNT-

- 1/BSF-3) in murine pituitary folliculostellate TtT/GF cells: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide-induced stimulation of NNT-1/BSF-3 is mediated by protein kinase A, protein kinase C, and extracellular-signal-regulated kinase1/2 pathways. *Endocrinology* **145**, 716-727.
- Wang, Y. & Fuller, G.M. (1994). Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes. *Mol Biol Cell* **5**, 819-828.
- Wang, Y. & Fuller, G.M. (1995). Interleukin-6 and ciliary neurotrophic factor trigger janus kinase activation and early gene response in rat hepatocytes. *Gene* **162**, 285-289.
- Ware, C.B., Horowitz, M.C., Renshaw, B.R., Hunt, J.S., Liggitt, D., Koblar, S.A., Gliniak, B.C., McKenna, H.J., Papayannopoulou, T., Thoma, B. & et al. (1995). Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* **121**, 1283-1299.
- Watt, M.J., Dzamko, N., Thomas, W.G., Rose-John, S., Ernst, M., Carling, D., Kemp, B.E., Febbraio, M.A. & Steinberg, G.R. (2006). CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* **12**, 541-548.
- Weiss, D.J., Liggitt, D. & Clark, J.G. (1999). Histochemical discrimination of endogenous mammalian beta-galactosidase activity from that resulting from lac-Z gene expression. *Histochem J* **31**, 231-236.
- Wu, Y., Diab, I., Zhang, X., Izmailova, E.S. & Zehner, Z.E. (2004). Stat3 enhances vimentin gene expression by binding to the antisilencer element and interacting with the repressor protein, ZBP-89. *Oncogene* **23**, 168-178.
- Yamamori, T., Fukada, K., Aebersold, R., Korsching, S., Fann, M.J. & Patterson, P.H. (1989). The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* **246**, 1412-1416.
- Yamamoto, T., Sekine, Y., Kashima, K., Kubota, A., Sato, N., Aoki, N. & Matsuda, T. (2002). The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 811-817.
- Yamamura, T., Namikawa, T., Endoh, M., Kunishita, T. & Tabira, T. (1986). Experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid apoprotein in Lewis rats. *J Neuroimmunol* **12**, 143-153.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W.Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. & Kishimoto, T. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 407-411.
- Yu, H. & Jove, R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* **4**, 97-105.
- Zauberman, A., Zipori, D., Krupsky, M. & Ben-Levy, R. (1999). Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* **18**, 3886-3893.
- Zhang, J. (2003). evolution by gene duplication : an update. *Trends in ecology and evolution* **18**, 292-298.
- Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., Kile, B.J., Kent, S.B., Alexander, W.S., Metcalf, D., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M. (1999a). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2071-2076.
- Zhang, L., Ong, W.Y. & Lee, T. (1999b). Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainate injections. *Exp Brain Res* **126**, 509-516.

- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C. & Chen-Kiang, S. (1995). Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* **267**, 1990-1994.
- Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J.E., Jr. (1994). Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4806-4810.
- Zurn, A.D., Henry, H., Schluep, M., Aubert, V., Winkel, L., Eilers, B., Bachmann, C. & Aebischer, P. (2000). Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells. *Cell Transplant* **9**, 471-484.
- Zvonic, S., Cornelius, P., Stewart, W.C., Mynatt, R.L. & Stephens, J.M. (2003). The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem* **278**, 2228-2235.